



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE BIOMATERIÁLŮ S
OBSAHEM AKTIVNÍCH PŘÍRODNÍCH UV FILTRŮ**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOMATERIALS WITH NATURAL UV FILTRES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Renata Pavelková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0985/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Renata Pavelková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace biomateriálů s obsahem aktivních přírodních UV filtrů

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) výběr polymerních materiálů a přírodních UV filtrů
- 2) charakterizace materiálů a jejich složek
- 3) testování biologických účinků připravených materiálů
- 4) využití připravených materiálů jako složek kosmetických přípravků

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Renata Pavelková
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací biomateriálů s obsahem aktivních přírodních UV filtrů. Teoretická část je zaměřena na vlivy slunečního záření na kůži a jak je možné se proti těmto vlivům bránit především díky použití kosmetických výrobků. Dále byly charakterizovány materiály a postupy využití k extrakci lipidového podílu z vybraných druhů rostlinného materiálu a mikroorganismů a přípravě a charakterizaci nanočástic a emulzí.

Praktická část se zabývá extrakcí lipidového podílu obsahujícího aktivní látky z vybraných druhů rostlinných zdrojů, kvasinek a řas. Dále byly tyto aktivní látky využity pro enkapsulaci do liposomových částic. U částic byla sledována jejich velikost, polydisperzitní index, koloidní stabilita, enkapsulační účinnost, vliv na SPF, antioxidační aktivita, obsah fosfolipidů a cytotoxicita vůči lidským keratinocytům. Tyto částice byly využity pro přípravu výsledné emulze, u které byla stanovena její míra ochrany proti UVB záření a stabilita pomocí analytické centrifugace.

ABSTRACT

This presented diploma thesis is focuses on preparation and characterization of biomaterials with natural UV filters. The theoretical part is aimed at effects of sunlight on the skin and how to avoid these effects by using cosmetic products. The materials and methods for extraction of lipid part of the selected vegetable and microorganism species and methods for preparation and characterization of nanoparticles and emulsions were characterized.

The practical part deals with extraction of lipid part of selected vegetable and microorganism species. The liposome particles with encapsulated active compounds were prepared. The particle size, polydispersity index, colloidal stability, encapsulation efficiency, SPF, antioxidant capacity, phospholipid content and cytotoxic effect on human keratinocytes were observed. These particles were used for preparation of the resulting emulsions. Their protection level on UV light were set and stability were tested by using analytical centrifugation.

KLÍČOVÁ SLOVA

UV filtry, antioxidanty, enkapsulace, liposomy, emulze, SPF, stabilita

KEYWORDS

UV filters, antioxidants, encapsulation, liposomes, emulsion, SPF, stability

PAVELKOVÁ, R. Příprava a charakterizace biomateriálů s obsahem aktivních přírodních UV filtrů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 76 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a řadu cenných rad. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a Ing. Jitce Bokrové za ochotu, trpělivost, cenné rady a pomoc při zpracování experimentální části. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě při mém úsilí podporovali.

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Sluneční záření.....	9
2.2 Kůže	9
2.2.1 Keratinocyty.....	11
2.2.2 Vystavení kůže UV záření	11
2.3 Reaktivní částice	12
2.4 Možnosti ochrany proti slunečnímu záření	12
2.5 Kosmetické přípravky pro ochranu proti nadměrnému slunečnímu záření	12
2.6 UV filtry	12
2.6.1 Fyzikální UV filtry	13
2.6.2 Chemické UV filtry	13
2.7 Označení SPF („Sun Protection Factor“)	14
2.8 Antioxidanty	14
2.8.1 Karotenoidy	15
2.8.2 Vitamín E.....	17
2.8.3 Koenzym Q10	17
2.9 Rostlinné zdroje antioxidantů	17
2.9.1 Rajče	17
2.9.1 Mrkev	17
2.9.1 Paprika	18
2.9.2 Špenát	18
2.10 Mikroorganismy jako zdroje antioxidantů	18
2.10.1 Karotenogenní kvasinky	18
2.10.2 Chlorella vulgaris	19
2.11 Metody extrakce lipofilních látek z přírodních zdrojů.....	19
2.11.1 Míchání, homogenizace a třepání	19
2.11.2 Vliv rozpouštědla	20
2.11.3 Extrakce lipidů dle Folche	20
2.12 Charakterizace extraktů.....	20
2.12.1 Kapalinová chromatografie.....	20
2.12.2 RP-HPLC	21

2.12.3	UV–VIS spektrometrie	21
2.13	Využití nanotechnologií v kosmetice	21
2.14	Liposomy	22
2.14.1	Příprava liposomů	22
2.14.2	Další typy částic a polymery používané pro jejich přípravu	23
2.14.1	Polyhydroxyalkanoáty	23
2.15	Charakterizace částic	25
2.15.1	Metody charakterizace enkapsulační účinnosti	25
2.15.2	Charakterizace velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla	25
2.15.3	Charakterizace stability částic	25
2.15.4	Stanovení antioxidační aktivity s využitím ABTS	26
2.15.5	Analýza cytotoxicity	27
2.1	Kosmetické přípravky na opalování	28
2.2	Emulze	28
2.2.1	Mechanismus emulzifikace	28
2.2.2	Hydrofilně–lipofilní rovnováha	29
2.2.3	Suroviny použité na přípravu emulze O/V	29
2.2.4	Analýza emulzí pomocí analytické centrifugace	31
3	Cíle práce	33
4	Experimentální část	34
4.1	Použité chemikálie	34
4.2	Kosmetické preparáty	34
4.3	Použité přístroje	35
4.4	Použité organismy	35
4.5	Optimalizace extrakce lipofilních látek z přírodních zdrojů	36
4.5.1	Extrakce dle Folche	36
4.6	Analýza extraktu lipofilních látek	36
4.6.1	Obsah aktivních látek stanovení pomocí HPLC	36
4.6.2	Měření UV–VIS spekter pomocí nanofotometru	37
4.7	Příprava liposomů metodou sonikace	37
4.8	Liposomy s přidavkem aktivních látek	38
4.9	Stanovení enkapsulační účinnosti	38
4.10	Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta-potenciálu	38

4.11 Stanovení antioxidační aktivity	38
4.12 Stanovení koncentrace fosfolipidů v liposomech	39
4.13 Stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu	39
4.14 Příprava kosmetických emulzí.....	39
4.14.1 Porovnávání absorbance v UVB oblasti a stanovení SPF	39
4.14.2 Příprava emulze O/V	40
4.14.3 Stanovení vlastností systémů pomocí analytické centrifugace.....	41
5 Výsledky a diskuze	42
5.1 Extrakce lipidových podílů ze vzorků.....	42
5.1.1 Vážkové stanovení obsahu sušiny.....	42
5.1.2 Optimalizace extrakčního kroku	42
5.1.3 Sledování stability extraktů v průběhu uchovávání	44
5.1.4 Analýza složení extraktů	46
5.2 Liposomové částice	47
5.2.1 Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta-potenciálu.....	48
5.2.2 Stanovení enkapsulační účinnosti	53
5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS	54
5.2.4 Stanovení koncentrace fosfolipidů v liposomech	55
5.2.5 Stanovení cytotoxicity	55
5.3 Emulze O/V	57
5.3.1 Stanovení SPF	57
5.3.2 Stanovení stability emulzí pomocí analytické centrifugace	62
6 Závěr	67
7 Bibliografie.....	69
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	76

1 ÚVOD

Většina energie na povrchu Země pochází z fotonů slunečního záření. To zahrnuje infračervené, viditelné a UV záření, které je zastoupeno 5 %. Vlivy UV záření na kůži mohou být jak pozitivní, jelikož je nutné pro syntézu vitamínu D₃, tak negativní, vyvolávající zánět, zarudnutí a přehřátí. Negativní vlivy však většinou převažují. Pokud je kůže opakovaně vystavována většímu množství UV paprsků, dochází jejich vlivem k chronickým změnám zahrnujícím urychlené stárnutí a vývoj kožních tumorů.

Přestože je kůže sama o sobě do jisté míry schopná se proti těmto negativním vlivům UV záření bránit, je důležité přirozené obranné mechanismy podpořit použitím kosmetických prostředků s UV filtry a antioxidanty. Současné kosmetické přípravky využívají často organické UV filtry, na které je řada lidí alergická. Dále jsou hojně využívány anorganické UV filtry jako oxid titaničitý a oxid zinečnatý. Navíc obsahují přípravky na ochranu proti slunečnímu záření i vitamín E, β -karoten a koenzym Q10, jelikož mají kromě antioxidační aktivity i vliv na ochranu proti UVA i UVB záření. Zvýšení stability, potlačení degradace a zvýšení fotoprotektivního efektu těchto aktivních látek, může být dosaženo při enkapsulaci do částic, které následně budou využity při formulaci kosmetického přípravku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sluneční záření

Slunce je přirozeným zdrojem elektromagnetického záření. Vyzařuje široké spektrum vlnových délek. Na zemský povrch však dopadá jen část tohoto záření, jelikož je filtrováno průchodem atmosférou a tím neobsahuje vlnové délky pod 290 nm. Při slunění na lidskou kůži dopadá záření ultrafialové (UV, 290–400 nm), viditelné (VR, 400–780 nm) a infračervené (IR, 780–3 000 nm) [1]. Infračervené záření se rozděluje na IRA (780–1 400 nm), také označované jako blízké, IRB (1 400–3 000 nm) a IRC (3 000 nm–1 mm). U infračerveného záření můžeme říci, že čím má záření delší vlnové délky, tím větší má zastoupení, ale méně proniká do pokožky. Podobně jako IR, tak i UV záření je rozděleno na UVC (100–290 nm), UVB (290–320 nm) a UVA, které dále dělíme na UVA II (320–340 nm) a UVA I (340–400 nm). U ultrafialového záření platí, že čím delší má vlnovou délku, tím větší má zastoupení a zároveň proniká hlouběji do pokožky. Naopak pokud má UV záření kratší vlnovou délku, má menší zastoupení, ale větší energii, kterou může způsobit vážnější poškození [2].

UVC záření (100–290 nm) díky svému využití při prostorové desinfekci operačních sálů a laboratoří se také nazývá germicidní. Běžně se s ním ale na Zemi nesetkáme, jelikož je odfiltrováno při průchodu atmosférou [1]. Proto je složení slunečního záření na povrchu Země složeno jen z měnících se poměrů UVA a UVB záření procházejícího atmosférou i při dnech, kdy je zataženo. Tato proměnlivost je dána řadou faktorů, jako je zeměpisná šířka, část dne, nadmořská výška, atmosférické podmínky a další [2]. Během typického letního dne je UV záření dopadající na zemi složeno z 96,5 % UVA a zbytek, tedy jen 3,5 % UVB záření. Při porovnání s celkovým zářením dopadajícím na zemi tvoří UVA složka 9,5 % [3].

UVB záření (290–320 nm) představuje 1% celého energetického objemu slunečního záření, které dopadá na zemský povrch. Po ozáření kůže vyvolává erytém, pigmentaci, je využíváno v dermatologické fototerapii [1] a přímo poškozuje DNA prostřednictvím tvorby thyminových dimerů [4].

UVA záření (320–400 nm) tvoří 4 % slunečního záření. Je využíváno především v soláriích a v dermatologické fototerapii. Může stejně jako UVB záření vyvolat erytém a pigmentaci, ale při sto- až tisícinásobné dávce. Proniká hlouběji do kůže, může tedy ovlivnit více hlubší struktury v kůži (imunosupresivní efekt, akcelerace aktinického stárnutí) [1]. Vytváří také velmi reaktivní druhy kyslíku, které nepřímo poškozují DNA [4].

2.2 Kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla. Představuje 16 % jeho celkové hmotnosti. Zajišťuje komunikaci organismu s vnějším prostředím a také chrání organismus před škodlivými vlivy. Zevní vrstva je relativně nepropustná pro vodu a brání ztrátám tekutin. Dále se podílí na termoregulaci organismu, účastní se některých metabolických pochodů a exkrece některých látek. Povrchový reliéf kůže vytváří individuální charakteristickou kresbu zvanou papilární linie (dermatoglyfy), která pomáhá při identifikaci osob [5]. Její vrstevnaté složení umožňuje co nejlépe vykonávat ochrannou funkci rozhraní mezi organismem a zevním prostředím. Kůže (*integumentum commune*) se skládá ze tří základních částí: *epidermis* (pokožka), *dermis* (korium, škára) a *tela subcutanea* (subcutis, podkoží, podkožní tuková tkáň) [6].

Epidermis je nejsvrchnější a zároveň nejtenčí (0,3–1,5 mm) část kůže [6]. Z kosmetického hlediska je tato vrstva velice důležitá, jelikož určuje texturu kůže, její vlhkost a přispívá i k její barvě [3]. Je tvořena především keratinocyty, melanocyty, Langerhansovými a Merkelovými buňkami. Epidermis se dělí na pět vrstev: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a nejpoверхovější *stratum corneum* [6].

Pro zevní aplikaci kosmetických přípravků je velice důležitá právě nejsvrchnější vrstva pokožky *stratum corneum*. Je to rohová vrstva skládající se z 15–20 vrstev plochých keratinizovaných buněk korneocytů, které jsou bez jádra. Jejich membrány jsou ztlustělé, buňky jsou vyplněny fibrilárními a amorfními proteiny. Důležitou složkou matrix, která zalévá svazky tonofibril, je vláknitý skleroprotein keratin [7]. Jsou zrohovatělé, zcela ploché, hustě na sebe kladené a tvoří šestiúhelníkové lamely, které jsou většinou seskupeny do sloupců. Kompaktní spodní část této vrstvy nazýváme *stratum conjunctum* a perifernější část, jež se olupuje, nazýváme *stratum disjunctum* [6]. *Stratum corneum* je pokryto proteinovým filmem, který se nazývá buněčná obálka („cell envelope“), ten pomáhá při zabránění ztráty vody a absorpci nežádoucích látek [3].

Důležitou složkou pokožky jsou kromě jiného také melanocyty, buňky jednotlivě se vyskytující v *stratum basale*. Melanocyty jsou mezi keratinocyty uspořádány pravidelně. Poměr počtu melanocytů a keratinocytů ve *stratum basale* je v dané oblasti konstantní. Mají sférický tvar s nepravidelnými, velmi dlouhými výběžky, které pronikají mezi *stratum basale* a *stratum spinosum*. Funkcí melanocytů je syntéza melaninu. Základním pochodem je přeměna tyrozinu působením tyrozinázy nejprve na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA), který se dalšími transformacemi mění v melanin. Melanin se poté uchovává v melanozomu. Jeho tvar bývá oválný, o rozměrech $0,4 \cdot 1 \mu\text{m}$. Zralé melanozomy migrují cytoplazmatickými výběžky melanocytů a jsou předávány keratinocytům *stratum spinosum* a *stratum basale*. V cytoplazmě keratinocytů se melaninová granula akumuluje v oblasti nad jádrem. Chrání dělicí se jádra před škodlivým účinkem ultrafialového záření [7]. Celkový řez pokožkou je zobrazen na Obr. 1.

Kůže zastává tedy hned několik ochranných funkcí, a to chemickou, biologickou a fyzikální.

Chemická bariéra využívá vlastnosti kyselého kožního pláště a acidorezistence keratinu. Agresivnější chemikálie s afinitou k bílkovinám se naváží na keratinocyty a s nimi se odloučí z kožního povrchu. Chemikálie, které proniknou hlouběji, jsou zachyceny Langerhansovými buňkami a indukují imunologické reakce se všemi důsledky [6].

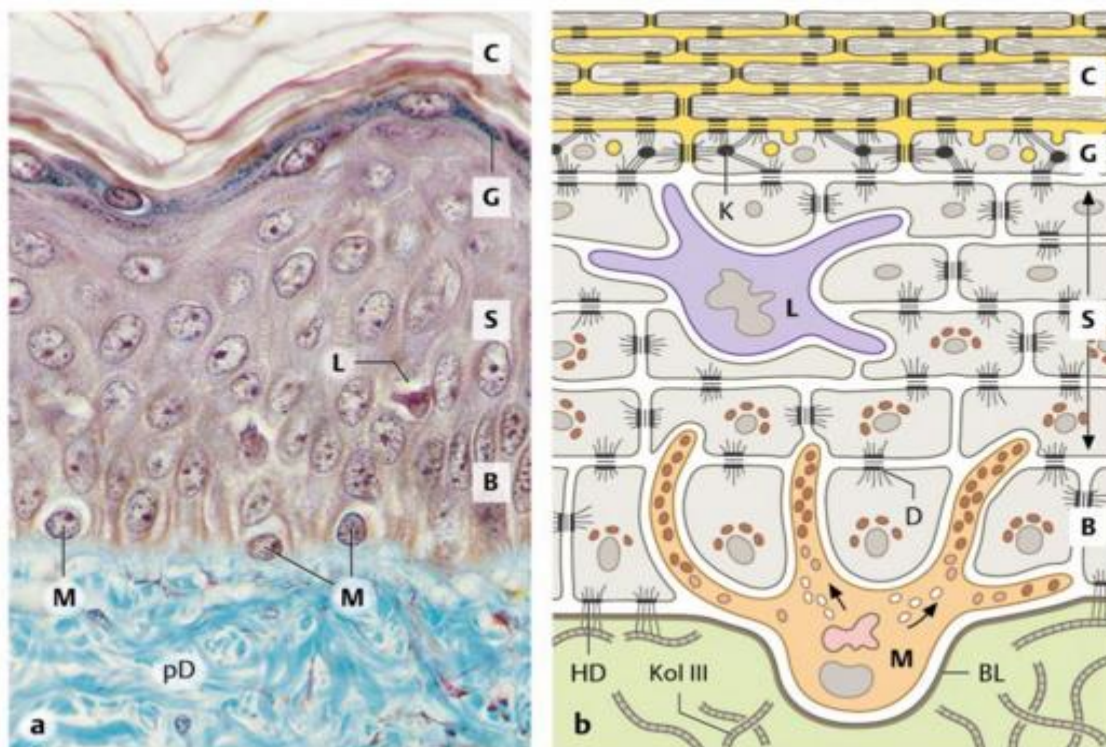
Biologická bariéra je zajišťována neporušenou rohovou vrstvou, která je překážkou pro koky a jejich enzymy. Kyselé pH ochranného kožního filmu (pH 5–6) působí antimikrobiálně, rezidentní kožní mikroflóra vykazuje antimikrobiální aktivitu proti bakteriím přechodné mikroflóry. Kolonizaci kožního povrchu podporuje přehnaná očista (detergenty, mýdlo), mechanické poškození, hyperkeratóza, macerace styčných ploch a mokvání [6].

Fyzikální bariéra má funkci mechanickou, kdy zajišťuje pevnost, pružnost a soudržnost. Dále má funkci elektrické bariéry, která funguje jako elektrický dipól (na povrchu elektronegativní a uvnitř pozitivní). Tímto fyzikálním jevem je ztížena penetrace iontů do kůže a souhlasně nabitě částice prachu, mikrobů a nečistoty jsou odpuzovány. Kůže disponuje také *fotoprotektivní funkcí* (ochrana především proti ultrafialovému záření). Podílí se na ní

rohová vrstva, keratohyalinové struktury *stratum granulosum* (odraz), obsah urokanové kyseliny, melaninu, aminokyselin, nukleových kyselin, beta-karotenu a hemoglobin (absorpce) [6]. Kůže má schopnost se na sezónní výkyvy adaptovat. Využívá k tomu ztlustění pokožky a melanogenezi [1].

2.2.1 Keratinocyty

Pro testování cytotoxicity a účinnosti připravených biomateriálů lze s výhodou použít lidské keratinocyty. Tyto buňky jsou hlavní buněčnou složkou vrstevnatého rohovějícího epitelu epidermis [8].



Obr. 1: Složení epidermis

a – kůže, tvář, zvětšeno 645x. *C* – *stratum corneum*, *G* – *stratum granulosum*, *S* – *stratum spinosum*, *B* – *stratum basale*, *L* – Langerhansova buňka, *M* – melanocyt

b – zjednodušené schéma, Kol III – fibrily kolagenu typu III. Šipky v *M* naznačují směr transportu dozrávajících melanosomů, převzato z [8]

2.2.2 Vystavení kůže UV záření

Výzkum stárnutí vlivem světla nám dovoluje lépe porozumět molekulární podstatě procesů stárnutí. UV záření prochází kůží v závislosti na své vlnové délce a interaguje s různými vrstvami kůže. UVB s kratšími vlnovými délkami je z větší části pohlceno v *epidermis*, kde ovlivňuje především keratinocyty. UVA o delších vlnových délkách proniká hlouběji a může interagovat s keratinocyty a dermálními fibroblasty. Kůže také obsahuje melanocyty - buňky vytvářející kožní barvivo melanin, které absorbuje UV záření a tím chrání kožní buňky před negativními účinky UV záření [2].

UVA záření většinou působí nepřímo pomocí tvorby reaktivních druhů kyslíku („reactive oxygen species“ ROS). ROS vykazují široké pole vlivu jako je peroxidace lipidů, aktivace

matricových metaloproteáz a poškozování jaderné i mitochondriální DNA. Také UVB záření může tvořit ROS. Hlavním mechanismem je interakce s DNA, která následně vyvolá její poškození [1], [4].

Poškození kůže sluncem může také navodit stav chronického zánětu, kdy jsou uvolňovány proteolytické enzymy, které poškozují dermální matrix. Spáleniny způsobené sluněním jsou velmi dobře známým akutním projevem vystavení slunci. Jsou klinicky viditelné jako zarudnutí zpuštěné zánětem. Poté co je kůže vystavena prahovému množství UV záření, nastává zpožděná a prodloužená vasodilatace. Ta umožní prostup lymfocytů a makrofágů do tkáně, což vyvolá zánět a projeví se jako chronický zánět. Pro snížení zarudnutí (tvorby erytému) způsobeného UV zářením, je doporučeno přijímat antioxidanty a protizánětlivé látky [2].

2.3 Reaktivní částice

Reaktivní druhy kyslíku ROS tvoří nedílnou součást metabolismu tkání, tedy i pokožky. Většina kyslíku v těle je použita v buněčném metabolismu. Molekulární kyslík je pomocí řady reakcí, kdy je odstraňován elektron, přeměňován na superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($HO\cdot$), až nakonec na vodu. K většině těchto reakcí dochází v mitochondriích a jsou spojeny s produkcí energie [9].

Superoxidový anion, hydroxylový radikál a peroxylový radikál patří mezi volné radikály, což jsou atomy nebo molekuly s nepárovým elektronem. Tyto částice jsou vysoce chemicky reaktivní s krátkou dobou života. Proto reagují přímo v místě, kde jsou tvořeny. Další reaktivní částice jako je molekulární kyslík, singletový kyslík (1O_2) a peroxid vodíku jsou schopné zahájit oxidativní reakci a vytvořit tak volné radikály [9].

2.4 Možnosti ochrany proti slunečnímu záření

Oblečení a brýle jsou hlavní složkou ochrany našeho těla před UV zářením. Míra ochrany, kterou může oblečení poskytnout, je ovlivněna tloušťkou látky, barvou, kdy tmavší barvy chrání více, dále pevností a vlhkostí. Postupem času se začíná dostávat oblečení s UV protektivní funkcí i ke komerčnímu využití pro osoby pracující ve venkovních prostorách a sportovce [10]. U takovýchto ochranných textilií je stupeň poskytované ochrany označován faktorem UPF („UV-protective Factor“) [6]. U brýlí je velice důležitá jejich schopnost ochrany proti UVA záření. Akutní poranění očí má podobné znaky jako ty, které má vliv UV záření na pokožku. Může způsobit zánět spojivek, zánět rohovky a v těžkých případech i přechodnou ztrátu zraku. Chronická expozice může vést až k šedému zákalu a makulární degradaci [10].

2.5 Kosmetické přípravky pro ochranu proti nadměrnému slunečnímu záření

Přítomnost UV filtrů v kosmetických přípravcích představuje klíčovou výhodu, kterou může kosmetika poskytnout. Nebezpečí, které ultrafialové záření představuje, je známo již dlouho. UV záření poškozuje pokožku přímo prostřednictvím vlivu na DNA a nepřímo, kdy ovlivňuje imunitní systém [2].

2.6 UV filtry

UV-filtry byly vyvinuty jako ochranný prvek před škodlivými vlivy ultrafialového záření. UV záření je v pokožce absorbováno řadou chromoforů, jako je melanin, DNA, RNA, proteiny,

aromatické aminokyseliny (např. tyrosin a tryptofan), lipidy, voda a jiné. Absorbování UV záření těmito chromofory vede k různým fotochemickým reakcím a sekundárním interakcím zahrnujícím reaktivní částice (kyslíku a dusíku), které vedou ke škodlivému účinku [10].

Kůže sama disponuje mechanismem antioxidační obrany, která zahrnuje enzymatickou a neenzymatickou složku. Jakožto enzymatický systém máme k dispozici superoxiddismutázu, katalázu a Se-glutathionperoxidázu, které převádějí superoxidový anion na peroxid vodíku a ten na vodu. Neenzymatickou složku zastupují četné endogenní antioxidanty jako glutathion, α -lipoová kyselina, koenzym Q a řada dalších. Antioxidanty jako jsou vitamíny a polyfenolové sloučeniny jsou získávány z potravy. Celkově má tento systém za snahu opravit poškozenou DNA. Přesto však může vlivem UV záření docházet k jejímu poškození, mutacím a genetické nestabilitě [4]. Zvýšení počtu ROS a zároveň vyčerpání antioxidačního systému způsobí oxidativní stres, který může vést až k poškození tkáně [2]. Obvykle tvoří obsah UV filtru v kosmetickém přípravku 0,1–10 % [11].

První kosmetické přípravky obsahující UV filtry působily pouze proti UVB záření, a tím působily především proti zarudnutí pokožky a spálení pokožky vlivem slunce. Nyní je kladen důraz blokovat také UVA složku, potlačit imunosupresi a tím zmírnit pravděpodobnost vytvoření melanomu [3].

2.6.1 Fyzikální UV filtry

Anorganické (fyzikální) UV filtry záření odrážejí a také dochází k rozptylu světla. Oba tyto jevy jsou uskutečňovány na širokém spektru záření od UV, přes viditelné až po infračervené. Těmito UV filtry jsou minerální mikročástice jako TiO_2 a ZnO [12]. Dalšími příklady může být talek (magnézium silikát), oxid železnatý a železičitý [6].

Fyzikální UV filtry jsou fotostabilní, ale při jejich použití je nutné nanést větší množství, aby bylo dosaženo požadovaného účinku [13]. Oxid zinečnatý disponuje lepší UVA ochrannou, zatímco oxid titaničitý vykazuje lepší UVB ochranu [14].

Miniaturizací částic na velikosti 10–50 nm se snížil rozptyl viditelného světla a posune se k nižším vlnovým délkám až pod rozsah UVA. Tímto se také dosáhne jejich lepší přijatelnosti k využití v kosmetických přípravcích, než jejich větší a neprůhledné varianty. Malé částice mají však vyšší tendenci k agregaci a tím se snižuje efektivita rozptylu světla. Díky vysoké fotostabilitě jsou fyzikální UV filtry využívány především pro sluneční ochranu dětí a jedinců alergických na organické UV filtry [4].

2.6.2 Chemické UV filtry

Organické UV filtry, také známé jako chemické, jsou zodpovědné za absorpci slunečního záření, především UVB [10]. UVB chemické filtry absorbované záření přeměňují na tepelnou energii [4]. Patří mezi ně například aminobenzoáty, cinamáty, salicyláty, benzošenony a další [6]. Většina těchto sloučenin absorbuje jen v určité oblasti, a proto je většinou nutné použít kombinaci několika UV filtrů za vzniku produktu s ochranou proti širokému spektru UV záření. Cinamáty a salicyláty se často používají v kombinaci s dalšími UVB filtry, aby se docílilo zvýšení SPF („Sun Protection Factor“). Organické a anorganické filtry mohou vykazovat synergistický efekt a také zvyšovat SPF [4].

2.7 Označení SPF („Sun Protection Factor“)

SPF se používá k označení účinnosti UVB filtru. Tato hodnota udává, kolikrát déle je možné setrvat na slunci při opalování, než vznikne erytém. V praxi, pokud u dané osoby vznikne erytém za 10 minut, po použití dostatečného množství opalovacího prostředku s SPF 10 by se tato doba měla prodloužit na desetinásobek, tedy 100 minut [6]. Při porovnávání účinností pak výrobek s ochranným faktorem 15 odfiltruje 94 % UVB paprsků [4], výrobek s ochranným faktorem 30 jich odblokuje 96,7 % a s SPF 60 98,3 % [6].

Tento faktor udává poměr energie UV záření potřebné k vytvoření MED („minimal erythemat dose“) v chráněné pokožce vůči nechráněné pokožce [15].

$$\text{SPF} = \frac{\text{minimální eryt. dávka v pokožce s ochranou}}{\text{minimální eryt. dávka v pokožce bez ochrany}} \quad (1)$$

Velice jednoduchá a spolehlivá je metoda určení SPF in vitro, kdy se u zředěného vzorku změří absorbance v rozmezí 290–320 nm s krokem 5 nm. Ze získaných dat vypočítáme SPF pomocí Mansurovy rovnice [16].

$$\text{SPF} = \text{CF} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda) \quad (2)$$

Kde CF je korelační faktor (10), EE (λ) je erytemogenní efekt záření při dané vlnové délce, Abs (λ) je spektrofotometrická absorbance vzorku při dané vlnové délce. Hodnoty EE·I jsou konstanty, které stanovili Sayre a kolektiv (1979) a jsou zobrazeny v Tab. 1 [15].

Tab. 1: Hodnoty konstant EE·I pro sluneční záření o vlnových délkách 290-320 nm s krokem 5 nm

λ [nm]	290	295	300	305	310	315	320
EE·I	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0837	0,0180

Kromě účinnosti ochranných prostředků v UVB oblasti pomocí SPF lze také měřit ochranný faktor u UVA záření, to je však obtížnější a tato měření nejsou jednotná [6].

2.8 Antioxidanty

Jsou definovány jako látky, které jsou do značné míry schopny potlačit nebo zpomalit oxidaci substrátu při přítomnosti již v malých koncentracích v porovnání s oxidovatelným substrátem. Z antioxidantu se při získání elektronu nestane volný radikál, jelikož je stabilní v obou formách [17]. V dermatologii jsou antioxidanty široce využívanými ingrediencemi pro topické použití. Naše tělo je neustále vystavováno působení oxidantů. Endogenní zdroje jsou spojeny s metabolismem, kdy enzymy účastníci se například mitochondriální respirace vytvářejí superoxid a peroxid vodíku, dále k tomuto přispívá i řada dalších enzymů jako lipoxxygenázy a NADH oxidáza. Vnější oxidanty pocházejí ze znečištění, jako kouř, smog, UV záření a strava. Jakožto odpověď na tyto stresy se vyvinula řada systémových antioxidantů, jejichž funkce spočívá v zachycení reaktivních částic kyslíku, předcházení poškození makromolekul jako jsou lipidy, DNA a proteiny [2]. Síť antioxidantů v kůži

zahrnuje vitamín E, vitamín C, glutathion, koenzym Q10 a kyselinu lipoovou. Ty jsou podporovány flavonoidy a karotenoidy [18]. Z tohoto výčtu antioxidantů se předložená práce zabývala především karotenoidy, vitamínem E a koenzymem Q10.

2.8.1 Karotenoidy

Karotenoidy zahrnují skupinu více než 600 sloučenin, které můžeme nalézt ve většině forem života, kde plní řadu různých funkcí od jejich původní vývojové funkce, jako fotosyntetické pigmenty, přes antioxidanty, prekurzory vitamínu A po barviva podílející se na vizuálním upoutání pozornosti u hmyzu jakožto opylovačů květin nebo u živočichů při výběru partnera na páření. Struktura karotenoidů je odvozena od fytoenu. Většinou jsou to uhlovodíky se čtyřiceti atomy uhlíku, které obsahují na svých koncích dva cyklické kruhy spojené řetězcem s konjugovanými dvojnými vazbami nebo polyenovým systémem. V rámci karotenoidů rozlišujeme především dvě skupiny, karotenoidy výhradně uhlovodíkové povahy a xanthofyly, které jsou jejich oxidovanými deriváty. Kyslík může být přítomen ve formě hydroxylové skupiny (*zeaxanthin*), oxy-skupiny (*kanthaxanthin*) nebo jako kombinace obou (*asthaxanthin*) [19].

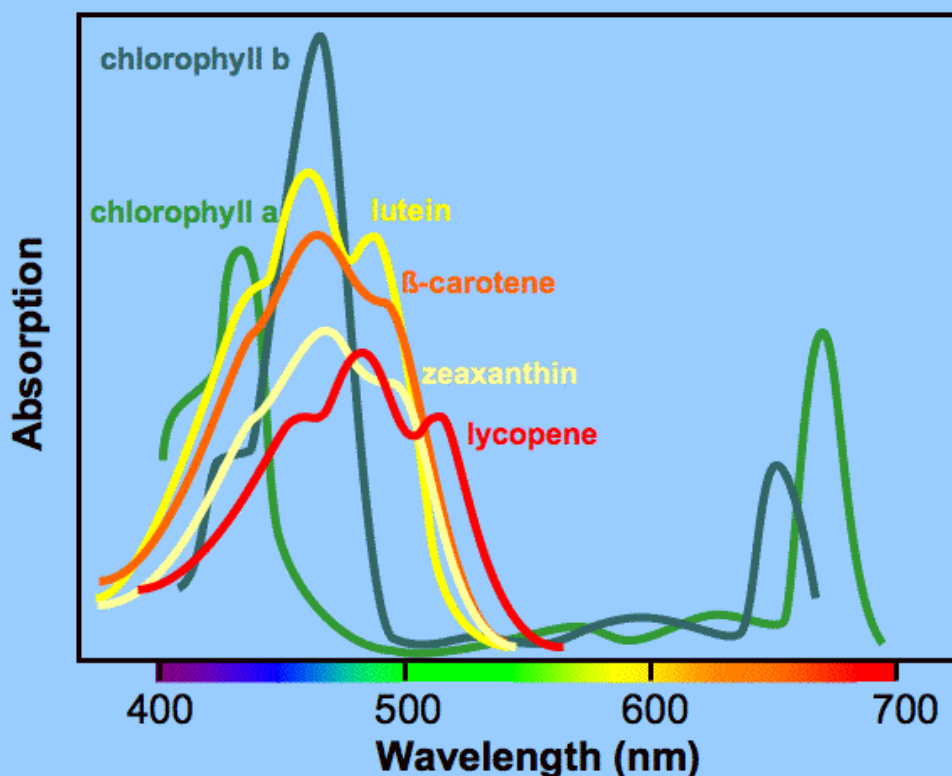
Karotenoidy také hrají významnou roli při ochraně rostliny před foto-oxidativním poškozením. Jejich absorpční spektra jsou zobrazena na Obr. 2. Zastávají funkci antioxidantů stejně tak jako zhášeců singletového kyslíku a peroxylového radikálu. U člověka se karotenoidy zapojují do systému antioxidantní obrany a synergicky interagují s dalšími antioxidanty. Mají za následek červené, oranžové a žluté zbarvení listů, plodů a květů u rostlin a dále také pigmentaci u některých druhů ptáků, hmyzu, ryb a korýšů. Přestože karotenoidy může obsahovat řada zvířat díky své stravě, schopnost jejich syntézy mají pouze rostliny, bakterie, houby a řasy [17].

Karotenoidy jakožto lipofilní molekuly vyžadují k absorpci živočišným organismem mechanismy pro absorpci tuků, jako jsou pankreatické šťávy, žluč či tvoření micel. Po absorpci vykazují tendenci k akumulaci v lipofilních částech buňky, jakou jsou lipoproteiny [17].

Karotenoidům je připisována řada důležitých funkcí zlepšujících zdravotní stav, jako je antioxidační aktivita, posílení imunitního systému a snížení rizika onemocnění degenerativními chorobami např. rakovina, kardiovaskulární choroby, šedý zákal a makulární degenerace. Kromě biologických vlastností jsou karotenoidy využívány jako přírodní antioxidanty při výrobě funkčních potravin nebo jako aditiva do potravin za účelem prodloužení jejich doby skladovatelnosti. Lykopen a β -karoten jsou povolenými přírodními barvivy pro potravinářství [20].

V rostlinách se ve většině případů vyskytují spolu s chlorofylem. Skupina karotenoidů je velice široká, jelikož tyto látky vytvářejí řadu stereoizomerů a příslušných esterů. Karotenoidy obsahující ve své struktuře β -iononový kruh jsou fyziologicky významné, jelikož plní funkci provitamínu A [21]. Celkově jsou tedy karotenoidy velice důležitou skupinou sloučenin nacházejících uplatnění ve farmaceutickém, chemickém, potravinářském průmyslu a zemědělství nejen díky tomu, že mohou být využity jako provitamin A, ale také pro svou barvu, antioxidační aktivitu a možné pozitivní účinky na snížení rychlosti růstu nádorů [19]. Lutein spolu se zeaxanthinem snižují riziko makulární degenerace spojené s věkem [22].

The photosynthetic pigments absorb much of the spectrum



Obr. 2: Absorpční spektra přírodních fotosyntetických pigmentů [23]

2.8.1.1 β -karoten

Tento oranžovo-žlutý pigment z řady karotenoidů se běžně vyskytuje jak v rostlinných, tak i v živočišných tkáních. Kromě produkce rostlinami ho dokáže syntetizovat i řada mikroorganismů jako je druh *Sphingomonas* (bakterie), *Dunaliella bardawil* (řasa), *Blakeslea trispora* (houba) a druh *Rhodotorula* (kvasinka). β -karoten je velice oblíbené aditivum do potravin, krmiv, kosmetiky a léčiv, především díky své barvě, antioxidačním a protinádorové aktivitě [24]. Kromě β -karotenu existují také α -karoten a γ -karoten. Ten je hlavní větvící bod v syntéze karotenoidů a je prekurzorem β -karotenu a torulenu. Z něj pak hydroxylací a oxidací vzniká torularhodin [18].

2.8.1.2 Lykopen

Lykopen (ψ,ψ -karoten) patří mezi jeden z karotenoidů nacházejících se v přírodě. Má necyklickou (alifatickou) a nevětvenou strukturu a je rozpustný v tucích. Lykopen se nejčastěji v přírodě vyskytuje jako *trans* karotenoid. Jeho hlavním zdrojem je rajče, to obsahuje až 5 mg lykopenu ve 100 g [17]. Je vysoce účinný zhášec singletového kyslíku. Významný pokles v citlivosti na erytém vyvolaný UV zářením byl pozorován při perorálním podávání po dobu 10–12 týdnů byl u zdravých dobrovolníků [10]. Dále je významný díky své vysoké absorpci modrého světla, které může významně poškodit buňku [18]. Lykopen je prekurzorem cyklických karotenoidů (β -karoten, γ -karoten, torulen, torularodin a astaxanthin) [19].

2.8.2 Vitamín E

Je hlavní lipofilní antioxidant v kůži a zároveň je nejpoužívanějším přírodním antioxidantem pro topické použití. Nachází se ve všech částech kůže, v dermis a epidermis, stejně tak jako ve *stratum corneum*. Vitamín E zahrnuje osm v přírodě se vyskytujících isoform, a to čtyři tokoferoly (α -, β -, γ -, δ -) a čtyři tokotrienoly (α -, β -, γ -, δ -). Veškeré formy obsahují chromanolovou hlavu, která nese redoxně aktivní fenolovou hydroxy- skupinu a lipofilní řetězec [2]. Vitamín E je produkován mazovými žlázami ve formě α - a γ -tokoferolu. Fakt, že je α -tokoferol tak silným antioxidantem, zároveň způsobuje jeho rozklad v přítomnosti kyslíku nebo při vystavení světlu. Z tohoto důvodu se v kosmetice využívá jeho stabilnější esterifikovaná forma α -tokoferol acetát. Ten však nepatří mezi antioxidanty a musí být převeden do aktivní formy [25]. Pokud je vitamín E podán přes pokožku, posiluje fotoprotekci. Pacienti, jež takto užívali vitamín E, byli méně spálení a jejich opálení bylo světlejší. Vitamín E je však fotosenzitivní a může být oxidován do inaktivní podoby [18].

2.8.3 Koenzym Q10

Koenzym Q10 je silný inhibitor volných radikálů, který zabraňuje oxidaci lipidů v plazmatické membráně. Hraje významnou roli v produkci buněčné energie. Přítomnost koenzymu Q10 v mitochondrii může také hrát roli v předcházení buněčné apoptózy vlivem oxidativního stresu, jelikož právě z mitochondrie se odesílají signály o apoptóze. Koenzym Q10 vykazuje antioxidační aktivitu a inhibici exprese kolagenáz v lidských fibroblastech, které byly vystaveny UV záření [25].

2.9 Rostlinné zdroje antioxidantů

Existuje celá řada rostlinných zdrojů obsahujících vysoké množství antioxidantů karotenoidní povahy. Patří k nim mimo jiné i mnoho zástupců ovoce a zeleniny, které jsou hojně dostupné po většinu roku. Přírodní směsi se schopností absorbovat UV záření mohou být izolovány právě z těchto zdrojů. V dalším textu jsou diskutovány vybrané druhy regionálních zástupců zeleniny, které byly vybrány pro experimentální část práce (rajče, mrkev špenát a paprika). Složení těchto vybraných druhů zeleniny je zobrazeno v Tab. 2.

2.9.1 Rajče

Lycopersicon esculentum patří do rodiny *Solanaceae*, která zahrnuje 1 500 tropických a subtropických druhů pocházející ze Střední a Jižní Ameriky. Rajče je výborným zdrojem karotenoidů a lykopenu, který mu dává jeho atraktivní červenou barvu [17]. Obsahuje různé bioaktivní látky jako je kyselina askorbová, tokoferoly, polyfenoly, karotenoidy, některé terpeny a steroly [20].

Červenou barvu rajčat způsobuje přítomnost lykopenu, který tvoří 95 % veškerých karotenoidů v rajčeti, a dále xantofyly a beta-karoten. Z dalších biogenních sloučenin obsahuje vitamín B1, B2 a vitamín C [21].

2.9.1 Mrkev

Mrkev obsahuje v porovnání s běžně využívanými druhy ovoce a zeleniny největší obsah β -karotenu a vysoký obsah minerálních látek s vhodným zastoupením mikroprvků a makroprvků [21].

2.9.1 Paprika

Paprika *Capsicum annuum* L. je druh zeleniny velice oblíbený u strážníků. Její barva může být červená, žlutá, zelená a oranžová. Různě barevné druhy papriky obsahují různé složení karotenoidů. Červená paprika obsahuje především kapsanthin a kapsorubin, lutein je převážně v paprice žluté a zelené a β -karoten se vyskytuje v oranžové paprice. Jelikož se v rostlinách druhu *Capsicum* vyskytuje vysoký podíl β -karotenu, lze je využít k doplňkové léčbě nedostatku vitamínu A [22]. Paprika obsahuje také řadu dalších vitamínů, jako je vitamín C, některé vitamíny skupiny B a vitamín E. Pálivou látkou v paprice je kapsaicin [21].

Tab. 2: Složení vybraných druhů zeleniny, převzato z [26], [27], [28] a [29].

množství	g/100 g						
zelenina	lipidy	cukry	vláknina	proteiny	voda	vitamín E	vitamín C
rajče	0,20	2,60	1,2	0,90	94,50	$0,54 \cdot 10^{-3}$	$14,0 \cdot 10^{-3}$
mrkev	0,24	4,70	2,8	0,93	88,00	$0,66 \cdot 10^{-3}$	$5,9 \cdot 10^{-3}$
špenát	0,40	0,40	2,2	2,90	91,40	$2,00 \cdot 10^{-3}$	$28,0 \cdot 10^{-3}$
paprika	0,30	4,20	2,1	0,99	92,21	$1,58 \cdot 10^{-3}$	$12,7 \cdot 10^{-3}$
množství	$\mu\text{g}/100 \text{ g}$						
zelenina	β -karoten	α -karoten	lutein + zeaxanthin		lykopen	β -kryptoxanthin	
rajče	449	101	123		2 573	0	
mrkev	8 285	3 477	256		1	0	
špenát	5 626	0	12 198		0	0	
paprika	1 624	20	51		0	490	

2.9.2 Špenát

Z výživového hlediska je zajímavý obsah β -karotenu, vitamínu C a kyseliny pantotenové. Důležitý je obsah minerálních látek (1,5 %), ze kterých mají nejvyšší zastoupení fosfor, vápník a železo [21].

2.10 Mikroorganismy jako zdroje antioxidantů

2.10.1 Karotenogenní kvasinky

Tato skupina kvasinek je schopna akumulovat až 70 % intracelulárních lipidů v poměru k biomase. Lipidové mikrokapičky jsou složeny z TAG s relativním zastoupením acylových zbytků mastných kyselin: olejová (18:1) > palmitová (16:0) > linolenová (18:2) = stearová (18:0). Klíčovým enzymem je ATP-citrátlyáza, jejíž aktivita rozhodne, zda je kvasinka schopná akumulace lipidů či ne. Produkce mikrobiálních lipidů typu SCO („single.cell oil“) pomocí kvasinek je mimořádně zajímavá, jelikož lipidotvorné kvasinky jsou schopné růst i na levných či odpadních surovinách, jako je syrovátka, melasa a ropa. Kromě druhů *Rhodotorula glutinis* a *R. graminis* sem patří také například druhy *Candida curvata*, *Lipomyces lipofear* a *Yarrowia lipolytica* [30].

2.10.1.1 *Rhodotorula*

Tento rod fermentačně neaktivních karotenogenních kvasinek náležících do pomocné třídy *Blastomycetes* má jméno podle řeckého slova „rhodeos“ (růžový) a z latinského slova

„torulus“ (lalůček, hrbolek). Mají značně vyvinutý pentózový cyklus využívání glukózy, tedy její přímou oxidaci. Jde o kvasinky oranžové až červené barvy, jelikož obsahují karotenoidní barviva. Ta je chrání před škodlivými účinky UV složky slunečního záření. Tato skutečnost jim umožňuje vyskytovat se ve větším množství v ovzduší [31]. Dále se také vyskytují v půdě, sladkých a slaných vodách, na rostlinách i v různých orgánech živočišného těla. Kolonie jsou hladké, lesklé a slizovité. V tekutém médiu tvoří *Rhodotorula* sediment a prstenec. Vytváří červené barvivo karotenoidní povahy, nerozpustné ve vodě, lokalizované na vnitřní straně plazmatické membrány a nedifundující do média. Podmínkou jeho tvorby je přístup kyslíku a světla [32].

Buňky rodu *Rhodotorula* jsem kulovité, subgloboidní až krátce oválné o velikosti 2–5 µm. Některé druhy této tukotvorné kvasinky jsou schopny vyprodukovat při růstu na půdě s vhodným poměrem C:N 64 % a více tuku v sušině [31].

Rhodotorula glutinis je studována již delší dobu a vykazuje potenciál pro průmyslovou výrobu karotenoidů, jelikož nabízí výhodu díky vysoké rychlosti růstu a využití nízkonákladových substrátů [24].

2.10.2 *Chlorella vulgaris*

Kromě makroskopických řas mohou být zdrojem surovin také mikrořasy. Tato skupina fotosyntetizujících mikroorganismů vyžaduje ke svému růstu pouze oxid uhličitý, vodu a živiny (např. dusík, fosfor a draslík) [33]. Biomasa obsahuje 48–58 % proteinů, 8–17 % uhlohydrátů, 14–22 % lipidů a 6–9 % popela. Kromě skladby aminokyselin má obsah živin podobný plodinám jako je sója [34]. Obsah lipidů může za určitých podmínek dosáhnout až 80 % obsahu biomasy [33].

2.11 Metody extrakce lipofilních látek z přírodních zdrojů

Extrakce pomocí rozpouštědla je nejpoužívanější způsob pro získání bioaktivního materiálu z širokého spektra rostlinných zdrojů. Je to jednotková operace používaná za cílem separace vybraných sloučenin z matrice (pevné nebo kapalné) založená na principu, kdy rozpouštědlo difunduje do matrice a rozpouští se v něm cílové látky. Při extrakci pevná látka-kapalina se cílová látka selektivně rozpouští ve zvoleném extrakčním činidle na rozdíl od zbylých komponentů pevné matrice. Existuje řada technik rozpouštědlové extrakce, avšak volbu konkrétní techniky určují především procesní podmínky, tedy povaha cílové sloučeniny, typ rozpouštědla a teplota [20].

2.11.1 Míchání, homogenizace a třepání

Míchání je běžná metoda používaná v průmyslu, všeobecně aplikovaná pro mleté materiály. Tato metoda zahrnuje míchání rozpouštědla společně s rostlinným materiálem, kdy jsou ponechány v kontaktu po dobu minut až hodin. Poté následuje krok separace rozpouštědla a pevný podíl je většinou podroben druhé extrakci [20].

Míchání zahrnuje spojení míchačky k nádobě obsahující surovinu, zatímco homogenizace zahrnuje směšování rozpouštědla a suroviny, které jsou následně ponechány v kontaktu bez dalšího míchání a protřepávání zahrnuje míchání směsi obsahující rozpouštědlo a surovinu. Dispergace částic v rozpouštědle pomocí míchání zajišťuje kontakt pevné látky s kapalnou,

což urychluje celý proces difuze extrahovaných složek a zabraňuje nadměrné saturaci v těsné blízkosti povrchu pevné látky, ze které je daný produkt extrahován [20].

2.11.2 Vliv rozpouštědla

Volba rozpouštědla je považována za nejdůležitější parametr celé extrakce. Jelikož je většina karotenoidů lipofilní, běžně se pro jejich extrakci využívají rozpouštědla jako je hexan, aceton, ethanol, ethylacetát, chloroform a petrolether, stejně tak jako směsi polárních a nepolárních rozpouštědel v různých poměrech. Rozpouštědla jako je diethylether a tetrahydrofuran nejsou využívána, jelikož mohou obsahovat peroxidy, které by mohly reagovat s karotenoidy [20].

2.11.3 Extrakce lipidů dle Folche

Metoda byla navržena roku 1951 Jordi Folchem. Původní postup zahrnoval dva kroky. V prvním je vzorek homogenizován s rozpouštědly (chloroform a methanol v poměru 2:1) a zfiltrován. V druhém kroku je filtrát promyt desetinásobným objemem vody od nečistot hydrofilní povahy. Spodní chloroformová fáze obsahuje lipidy a vrchní vodná fáze obsahuje nečistoty. Tento krok zahrnoval ztrátu 1 % lipidů [35].

Tato metoda je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem vody a polárních lipidů jako fosfolipidů a komplexních lipidů, tedy zdrojů živočišného původu. Proto se využívá pro analýzu například masa a masných výrobků. Methanol umožní kvantitativní extrakci lipidů vázaných na bílkovinné podíly. Ztráty gangliosidů a některých dalších velmi polárních lipidů se dají snížit přidáním chloridu draselného nebo chloridu vápenatého do promývací vody [36].

2.12 Charakterizace extraktů

Složení lipidových extraktů lze provést řadou technik, analýzu karotenoidů pak především pomocí kapalinové chromatografie a dále také pomocí UV–VIS spektrofotometrie.

2.12.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda založená na separaci složek vzorku mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Pohybem mobilní fáze je vzorek unášen soustavou. Jednotlivé složky vzorku jsou zadržovány stacionární fází různě dlouho, tak jsou od sebe separovány. Na dělení se podílejí interakce složek vzorku se stacionární fází a rovněž také zvolená mobilní fáze [37].

Pro zvýšení účinnosti kapalinová chromatografie se během posledních let vyvinula HPLC („High Performace Liquid Chromatography“). Její výhodou je vysoká rychlost a účinnost, kterých je dosaženo díky vysokým průtokům a tlakům, mobilní fáze a s použitím krátkých kolon naplněných jemnými částicemi. Pohyb eluentu je zabezpečen vysokotlakým čerpadlem [37].

Přestože je kapalinová chromatografie méně citlivá (menší rozlišení), je velice často využívána ke kvantitativním analýzám, jelikož můžeme analyzovat i málo těkavé sloučeniny [11].

2.12.2 RP-HPLC

Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi = reverzní chromatografie („reversed-phase chromatography“, RP) s nepolární stacionární a polární mobilní fází. Umožňuje separaci velkého množství organických sloučenin, ale i komplexů elektricky neutrálních, popřípadě s omezenou polaritou. Retence sloučenin klesá v řadě: aklany>aromáty>halogenové deriváty uhlovodíků>ethery>nitrosloučeniny>estery>aminy>amidy>karboxylové kyseliny>sulfonové kyseliny [38].

Nejčastěji se jako detektor využívá UV-VIS spektrometr. Může být použit jak spektrometr s jednou vlnovou délkou, nebo detektor s diodovým polem DAD, který umožňuje snímat pro každý pík celé spektrum a tím posloužit i pro identifikaci [11].

2.12.3 UV–VIS spektrometrie

Jak již bylo zmíněno výše, spektrometrie bývá velice často používána při detekci po separaci pomocí chromatografie. Je možné ji však použít i jako samostatnou metodu.

Absorpční spektrofotometrie patří mezi optické metody, založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením. Oblast použitého záření se pohybuje od UV v rozmezí 200-400 nm do viditelného záření 400-800 nm [37].

Kvantitativní analýza je založena na Lambert-Beerově zákoně, kdy hodnota absorbance A je přímo úměrná látkové koncentraci $[mol \cdot l^{-1}]$ při dané vlnové délce a závislá na tloušťce kyvety l [cm] a molárním absorpčním koeficientu ε_λ $[dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$.

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Platnost tohoto zákona je dodržena pro monochromatické záření při nízkých koncentracích (menších než $10^{-2} mol \cdot l^{-1}$) [37].

Pokud bychom chtěli určit obsah látky s funkcí UV-filtru přímo v kosmetickém přípravku, byla by naše práce ztížena faktem, že prostředí, v kterém je daná látka rozptýlena, by mohlo interferovat [11].

2.13 Využití nanotechnologií v kosmetice

Kosmetický průmysl byl jeden z prvních, který začal využívat nanotechnologické principy ve vývoji nových produktů. Během let 1994 až 2005 byla firma L`Oreal SA hodnocena jako 5. společnost na světovém trhu, která podala nejvíce patentů souvisejících s nanotechnologiemi [39]. Pravděpodobně nejběžnějším využitím nanotechnologií v kosmetice je zvýšení prostupu kosmetických ingrediencí do kůže. K tomuto účelu lze využít například liposomy. Nanomateriály mohou také sloužit k zvýšení stability ingrediencí, které mohou podléhat rozkladu vlivem oxidace a z jiných důvodů [40].

V návrhu doporučení Evropské komise je nanomateriál definován, jako materiál, který splňuje alespoň jedno z následujících kritérií:

- obsahuje částice, s jedním a více rozměry v rozmezí 1–100 nm, které jsou zastoupeny ve více než 1 % velikostní distribuce
- mají vnitřní nebo povrchové struktury, které v jedné nebo více dimenzích mají velikost od 1–100 nm

- mají poměr specifické povrchové plochy k objemu větší než $60 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$, s výjimkou částic menších než 1 nm [39].

2.14 Liposomy

Jako liposomy označujeme váčky tvořené přírodními nebo uměle připravenými lipidy (fosfo- a sfingolipidy), které mohou obsahovat další součásti dvojvrstvy jako cholesterol a hydrofilní polymery konjugovaných lipidů [41]. V 60-tých letech Bangham a kolektiv demonstrovali, že disperze fosfolipidů ve vodném roztoku vede k vytvoření uzavřených vezikulárních struktur. V roce 1986 se na trhu objevil první produkt obsahující liposomy- Capture® [2]. Schopnost samotvoření mají liposomy díky své amfifilní povaze. Polární hlavička směřuje do polárního rozpouštědla (vody) a tím chrání nepolární konce [42]. Struktura liposomů je identická se strukturou buněčné membrány. Díky této podobnosti byly navrženy jako vhodný nosičový systém pro zlepšení přenosu aktivních látek do kůže [43].

2.14.1 Příprava liposomů

Možností přípravy liposomů je nepřeberné množství. Při různých způsobech přípravy vznikají liposomy o různé velikosti a lamelarity. Podle lamelarity rozlišujeme jednodamelární liposomy (ULV „unilamellar vesicles“) a multilamelární (MLV „multilamellar vesicles“). Poslední je rozdělení podle velikosti SUV malé jednodamelární a LUV velké unilamelární váčky [44]. Během bakalářské práce byl postup přípravy liposomů optimalizován a bylo dosaženo závěru, že nejlepším postupem je v tomto případě sonikace.

Je to nejrozšířenější metoda pro přípravu SUV. Multilamelární liposomy jsou sonikovány pomocí vaničkového nebo sondového sonikátoru. Mezi další metody, kterými lze z MLV připravit LUV a SUV, patří také French press a membránová extruze [45], [46].

Hlavními nevýhodami liposomů připravených pomocí sonikace, jsou malý vnitřní objem a tím i nižší enkapsulační účinnost, degradace fosfolipidů a sloučenin k enkapsulaci a v neposlední řadě také kontaminace kovy ze sonikační sondy. Během sonikace nemusí dojít k rozbití všech multilamelárních vesikul, a tak mohou koexistovat spolu s malými unilamelárními vesikly, což vede k zvýšení polydisperzity a je nežádoucí [45].

Dále lze liposomy připravit např. metodami odpaření na tenké vrstvě, kdy jsou vytvořeny MLV při rehydrataci lipidového filmu vodním pufrem [47]. Dvoukrokovým procesem je metoda odpaření reverzní fáze, kdy je nejprve připravena emulze fosfolipidů a pufru v přebytku organického fáze a následného odstranění organické fáze za sníženého tlaku [44]. Pomalým odstraňováním rozpouštědla se z emulze tvořené micelami vytvoří gelovitá hmota. Při dalším odpařování se gel zhroutí. Přebytek fosfolipidů vede k seskupení druhé vrstvy okolo micel a tím k vytvoření liposomů [45]. Pomocí membránové extruze se suspenze multilamelárních liposomů extruduje několikrát přes polykarbonátovou membránu se stejnými póry válcovitého tvaru. Střední velikost liposomů se snižuje se zvyšujícím se transmembránovým tlakem a počtem cyklů extruze. Metoda je často využívána pro redukci MLV na SUV a LUV [46]. V neposlední řadě lze také připravit liposomy metodou ethanolového, popřípadě etherového vstříkávání, odstraněním trichloracetátu sodného z lipidů dialýzou, opakovaným zamražením a roztáním liposomů a dehydratací a rehydratací SUV [44].

2.14.2 Další typy částic a polymery používané pro jejich přípravu

Kromě liposomů jsou pro enkapsulaci aktivních látek do kosmetických přípravků používány i další polymery – syntetické i přírodní. Polymerní částice patří mezi nadějně typy nosičů, zejména nosiče připravené z polymerů snadno degradovatelných *in vivo*. Lze využít polymery, resp. biopolymery v nativní formě i po vhodné chemické či fyzikální modifikaci. K nejvíce používaným syntetickým polymerům v kosmetice patří PVA (poly(vinylalkohol)), PAA (poly(akrylamid)), PEO (poly(ethylenoxid)), PPO (poly(propylenoxid)), PVP (poly(vinylpyrolidon)) [48]. Z přírodních biopolymerů pak jsou využívány zejména poly α -estery jako kyselina poly-L-mléčná, polyglykolová kyselina, kopolymer kyseliny mléčné a glykolové a poly(ϵ -kaprolakton) dále polyalkylkyanoakryláty, krystalická celulóza, chitosan, alginát, kyselina hyaluronová, cyklodextriny, škrob a jeho deriváty a další [49].

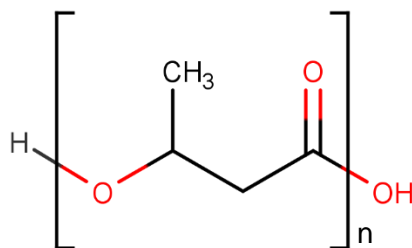
Syntetické polymery a způsoby jejich výroby umožňují připravovat materiály s dobře definovatelnou a reprodukovatelnou strukturou, dobrými mechanickými vlastnostmi i degradabilitou. Jejich aplikace zejména v medicíně, případně kosmetice či výživě ale často narážejí na problémy s nízkou bioaktivitou a biokompatibilitou, které mohou vést k zánětům, vyvolání nežádoucí imunitní odpovědi nebo přímo k toxicitě materiálů. Přírodní polymery tyto problémy často nemají, zase ale trpí variabilitou vlastností v závislosti na jejich zdroji, mikrobiální kontaminaci a obvykle horšími mechanickými vlastnostmi. Jednou ze zkoumaných možností, jak všechny tyto problémy řešit, je příprava materiálů kombinujících oba druhy polymerů [48].

Jedním z vhodných biopolymerů jsou mikrobiální polymery – polyhydroxyalkanoáty, jež jsou biokompatibilní a rovněž plně biodegradabilní. PHA patří stejně jako polymery kyseliny mléčné do skupiny polyesterů; potenciál PHA pro přípravu částicových nosičových systémů s výhodnějšími vlastnostmi je stále velmi málo prozkoumán [49], [50].

2.14.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty jsou intracelulární polyestery, které jsou vytvářeny a uchovávány ve formě granulí při nadbytečném přísunu zdroje uhlíku u více než tří set druhů Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií i archeí [50]. Slouží mikroorganismům především jako zásobárna energie. Jakmile v médiu začne docházet zdroj uhlíku, nastoupí depolymerázy a rozloží uložené PHA. Produkty této degradace jsou využity v buněčném metabolismu [51].

Jejich fyzikální vlastnosti jsou podobné polyetylenu a polypropylenu. Jsou izotaktické, opticky aktivní, piezoelektrické a termoplastické. Pro svou biokompatibilitu a biodegradabilitu byly navrženy jako vhodné materiály pro biomedicínské aplikace [50]. Komerčně nejedostupnější a zároveň nejvíce studované jsou PHA s krátkým řetězcem s 3 až 5 atomy uhlíku, především poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) zobrazen na Obr. 3 a poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) (PHBV). Jejich hlavní nevýhodou jsou vysoké produkční náklady. Ty však lze snížit utilizací odpadních zdrojů uhlíku, např. jablečné vlákniny, kukuřičné píce [52], kávové sedliny [53], fritovacího oleje [54] nebo navíc degradovat aromatické sloučeniny (fenol, naftalen, 4-chlorfenol) přítomné v přírodě pomocí bakterie *Bacillus sp.* CYR1, za současné produkce PHB [55].



Obr. 3: Vzorec pro PHB (poly(3-hydroxybutyrát))

Poly-3-hydroxybutyrát byl poprvé izolován a charakterizován v roce 1926. Je to termoplastický polymer s teplotou skelného přechodu 4–7 °C a teplotou tání 175–180 °C. Jelikož je izotaktický jeho lineárními řetězce mají tendenci vytvářet během krystalizace velké sferulity, což vede k vysoké krystalinitě (> 60 %) a v důsledku toho je výsledný materiál křehký [50].

2.14.1.1 Specifika přípravy částic na bázi PHA

K přípravě částic z hydrofobního polymeru PHA se využívají některé specifické techniky. Jednou skupinou metod je tzv. mikroenkapsulace, která využívá koacervaci, sprayování a vypařování rozpouštědla a umožňuje produkci částic do 1 µm. Při nanoprecipitaci dochází ke spontánní emulzifikaci a vznikají částice menší než 1 µm. Nejprve je polymerní materiál, který bude tvořit tělo částice, rozpuštěn v semipolárním organickém rozpouštědle mísitelném s vodou (aceton nebo směs acetonu s ethanolem). V tomto případě dochází k difuzi, která zapříčiní samovolnou emulzifikaci. Další možností je využít rozptýlení aktivní látky v roztoku polymeru pomocí vysokorychlostního míchání, nebo rozpustit aktivní látku přímo v roztoku polymeru. Následně je rozpouštědlo odstraněno pomocí odpařování, pomocí vyšší teploty, vakua, kombinací obou nebo pomocí cross-flow-filtrace. Dalším krokem je promytí částic vodou a izolace pomocí centrifugace, membránové filtrace nebo tzv. „freeze drying“ procesů [56].

V průběhu nanoprecipitace pomocí výměny rozpouštědel (tzv. „solvent displacement technique“) je PHB nejprve rozpuštěno v acetonu a vstříkováno kapku po kapce do destilované vody s Tween-80 za stálého míchání. Jelikož aceton je mísitelný s vodným prostředím, ale PHB je ve vodě nerozpustný, vede tento krok k vytvoření částic. Aceton je přidáván až do 30 % (v/v). Vzniklý roztok je centrifugován při 16 000 rpm po dobu 1 hodiny. Získaný pelet je resuspendován v destilované vodě k získání samotných částic [51].

Metoda využívající směšování polymerů (tzv. „polymer blending“) je nejekonomičtější a univerzální možností, jak připravit materiály spojující kýžené vlastnosti různých polymerů, které umožní širší uplatnění těchto biopolymerů. Jednou z jednoduchých variant je produkce pomocí směšování PHA s malými molekulami jako je β-karoten, sójový olej nebo tri(ethylen glykol) bis(2-etylhexanoát) jako nukleačních činidel nebo změkčovadel ke snížení velikosti sferulitů a zabránění vytvoření prasklin [50].

Směšováním homopolymerů a kopolymerů s polyhydroxyalkanoáty byly vytvořeny směsi s širokým rozptylem vlastností, např. poly(L-mléčná kyselina) (PLA), poly(ε-kaprolakton) (PCL), poly(propylen karbonát), poly(vinyl pyrrolidon), poly(metyl acrylát), škrob, chitosan, acetobutyrate celulózy a kopolymer acetobutyrate celulózy s poly(ethylen glykolem) [50].

2.15 Charakterizace částic

Aby bylo možné připravené částice dále zkoumat a porovnávat jejich vhodnost pro využití v kosmetice, je obvykle nutné je charakterizovat podle různých kritérií. Mezi hlavní porovnávané vlastnosti částic patřila enkapsulační účinnost, velikost, stabilita a dále také antioxidační aktivita, obsah fosfolipidů a podobně. Součástí ověření bezpečnosti nanočástic je testování cytotoxicity [57], [58], [59], genotoxicity [60] a dalších potenciálně negativních účinků na biologické systémy.

2.15.1 Metody charakterizace enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost nám udává, kolik procent z aktivní látky se inkorporovalo do liposomů, kdy aktivní látka může být dle své lipofilní či hydrofilní povahy umístěna v jejich dvojvrstvě nebo ve vnitřní vodní kavitě. Pro výpočet enkapsulační účinnosti, je nutné vědět použité množství dané látky a poté určit koncentraci aktivní látky v okolním roztoku a také v samotných liposomech.

Podle povahy enkapsulovaných látek lze pro stanovení jejich obsahu zvolit vhodnou kvantitativní metodu, např. UV–VIS spektrofotometrii, kapalinovou chromatografii a další.

2.15.2 Charakterizace velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

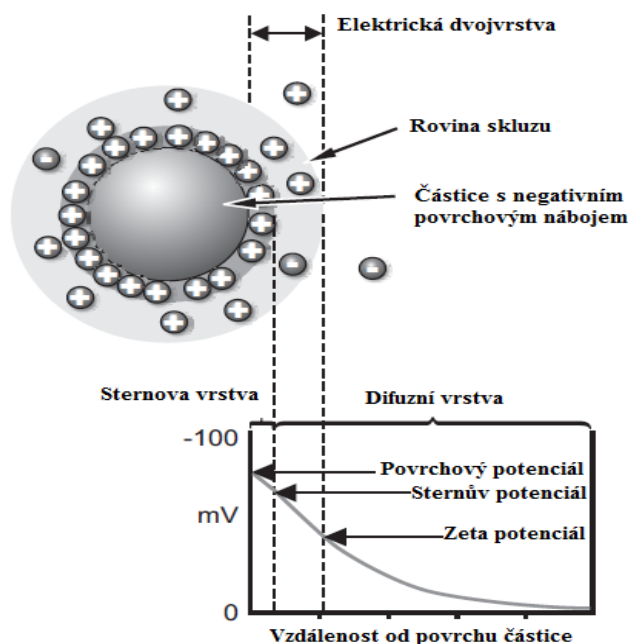
Částice se v roztoku neuspořádaně pohybují díky tomu, že do nich narážejí okolní molekuly. Tento pohyb je označován jako Brownův pohyb. Rychlost pohybu částic závisí na jejich velikosti. Je známo, že malé molekuly se v roztoku pohybují rychleji a velké pomaleji. Tento pohyb částic neustává, a proto pořídíme-li za sebou dva snímky ve velice krátkém časovém sledu (100 μ S), můžeme vidět, jak moc se částice pohnula, a tak zjistit i jak je velká. Pokud známe vztah mezi difuzní rychlostí a velikostí, můžeme určit velikost částice [61].

Dynamický rozptyl světla (PCS – Fotonová korelační spektroskopie) měří Brownův pohyb a vztahuje ho k velikosti částice. Částice vzorku jsou osvětlovány laserem a následně jsou analyzovány odchylky intenzity rozptylu světla [61].

2.15.3 Charakterizace stability částic

Zeta potenciál se měří pomocí kombinace elektroforézy a laserové Dopplerovy velocimetrie (laserová Dopplerova elektroforéza). Tato technika měří, jak rychle se částice pohybují v kapalině v elektrickém poli. Jakmile známe rychlost pohybu částice a velikost použitého elektrického pole, můžeme pomocí dvou známých konstant vzorku (viskozita a dielektrická konstanta) vypočítat zeta potenciál [61].

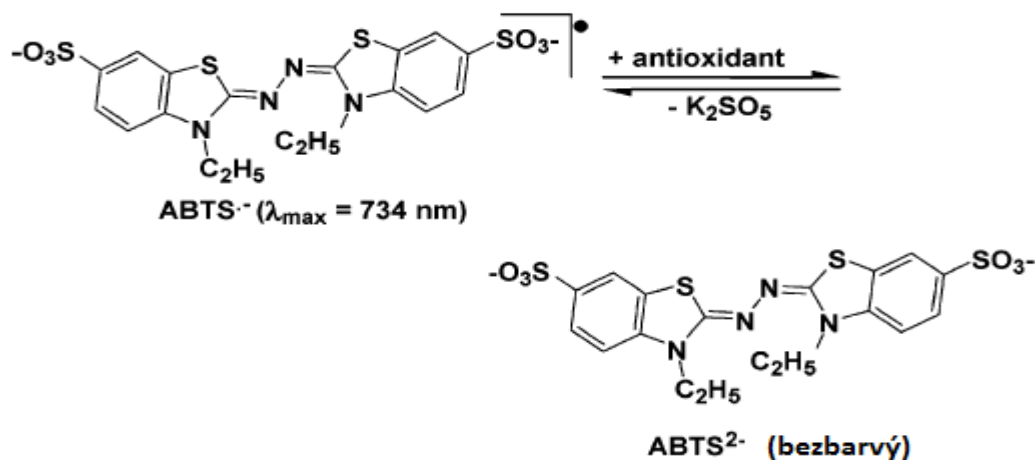
Rozsah zeta potenciálu udává potenciální stabilitu koloidního systému. Pokud mají veškeré částice systému výrazně negativní nebo pozitivní zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat, a naopak nebudou mít tendenci k shlukování. Pokud však mají částice nízký zeta potenciál nepůsobí na ně žádné odpudivé síly a dochází k flokulaci. Všeobecně se za hraniční hodnoty považují -30 mV a $+30$ mV. Pokud je zeta potenciál mezi těmito hodnotami, takovéto částice považujeme za nestabilní [61]. Obr. 4 znázorňuje částici s negativním povrchovým nábojem, její elektrickou dvojvrstvu a zeta potenciál. Hodnota zeta-potenciálu je výrazně závislá na pH. Hodnota pH, při které je částice neutrální se nazývá isoelektrický bod. Při tomto pH je systém nejméně stabilní [61].



Obr. 4: Znáznornění částice se záporným povrchovým nábojem. Převzato a upraveno z [61].

2.15.4 Stanovení antioxidační aktivity s využitím ABTS

Oxidativní stres může přispět k vývoji řady negativních fyziologických stavů. Sledování antioxidační aktivity různých látek je cílem řady analytických metod. TEAC analýza „Trolox equivalent antioxidant capacity“ byla poprvé představena Millerem v roce 1993 [62]. Od té doby se dále vyvíjela. Principem vylepšené formy této metody je pohlcování radikálu $\text{ABTS}^{\bullet-}$ (oxidant), předem vytvořeného pomocí oxidace 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina) (ABTS^{2-}) persulfátem [63]. Dochází k odbarvení $\text{ABTS}^{\bullet-}$ pomocí sloučeniny, která vykazuje antioxidační aktivitu. Tato reakce je zobrazena na Obr. 5. Výsledná barevná změna je úměrná množství radikálu pohlceného po dané době (většinou 5 min) a zároveň se dá vztáhnout ke koncentraci troloxu [64]. Trolox je ve vodě rozpustný analog vitamínu E a používá se v této analýze jako standard. Zaznamenáván je tedy pokles absorbance při $\lambda = 734 \text{ nm}$ [65].



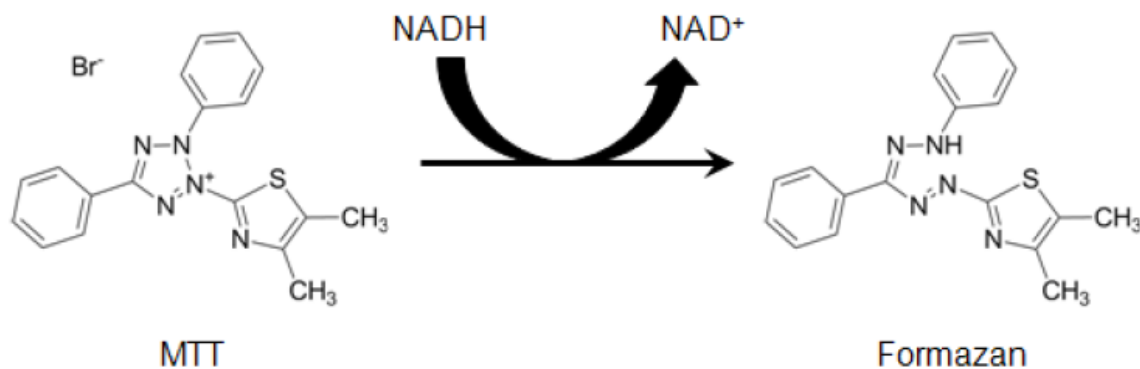
Obr. 5: Reakce přeměny fialového ABTS radikálu na bezbarvý produkt. Převzato a upraveno z [63].

2.15.5 Analýza cytotoxicity

Testování buněčné proliferace je častou metodou pro přímé určení, zda daná látka působí cytotoxicky a vede nakonec k usmrcení buňky. Redukce tetrazoliových solí, redukce resazurinu a analýza proteázové aktivity zkoumají součásti obecného metabolismu nebo enzymatickou aktivitu jakožto parametrů referujících o zdraví buňky. Všechny tyto metody vyžadují inkubaci reagentu s populací živých buněk, aby mohlo dojít k přeměně substrátu na barevný či fluorescenční produkt, který může být posléze detekován například pomocí ELISA readeru. Většinou při standardních kultivačních podmínkách je barevná změna produktu proporcionálně úměrná počtu živých buněk. Pokud buňka zemře, její schopnost přeměny substrátu v produkt rapidně klesá [66].

2.15.5.1 MTT test

Tetrazoliovou sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid, methylthiazolyl-tetrazolium neboli MTT navrhl pro testování cytotoxicity buněk v roce 1983 Mosmann [67]. Předpokládá se, že jejím základním principem je přeměna žluté tetrazoliové soli pomocí mitochondriálního enzymu sukcinát dehydrogenázy v živých buňkách na fialový formazan, který vytváří krystalky nerozpustné ve vodě [57]. Přesný mechanismus redukce MTT na formazan není zatím zcela objasněn, ale pravděpodobně zahrnuje reakce s NADH nebo podobnými redukčními molekulami, které transportují elektrony na MTT (viz Obr. 6) [66]. Formazan musí být opětovně rozpuštěn, aby bylo možné vzorky dále spektrofotometricky analyzovat. Půdně byl rozpouštěn pomocí isopropanolu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou [67]. Dále je také možné použít DMSO, dimethylformamid, SDS a kombinaci detergentu a organického rozpouštědla [66].



Obr. 6: Struktura žlutého MTT a fialového produktu formazanu [66].

Mezi další testy využívající kolorimetrické stanovení patří SRB test a test využívající Alamarovu modř. Sulforhodamin B (SRB) je sytě růžové aminoxynthenové barvivo. V mírně kyselém prostředí se SRB naváže na bazické aminokyseliny proteinů v buňkách fixovaných trichloroctovou kyselinou. V tomto případě je buněčná kultura fixována trichloroctovou kyselinou a barvena 30 min 0,4 % roztokem sulforhodaminu B (SRB) rozpuštěným v 1 % kyselině octové. Přebytné barvivo je odstraněno promytím 1 % kyselinou octovou. Promytí je opakováno čtyřikrát. Barvivo navázané na proteinech je

extrahováno 10 mM tri(hydroxymethyl)aminomethanem pH 5 a následně je analyzována optická hustota při $\lambda = 564$ nm [59].

Alamarová modř je citlivý oxidačně-redukční indikátor, který fluoreskuje a mění svou barvu po redukci živými buňkami. Přeměna je pravděpodobně indukována mitochondriálními enzymy živých buněk. Po přidání alamarové modři jsou vzorky inkubovány po dobu 5 hodin, a poté vystaveny excitačnímu záření o vlnové délce 530 nm. Emise je měřena při 590 nm. Procentuální zastoupení živých buněk je vyjádřeno intenzitou fluorescence testovaných složek jako procenta z intenzity fluorescence kontrolního vzorku [57].

2.1 Kosmetické přípravky na opalování

Pro ochranu proti slunečnímu záření se používá řada přípravků, které mohou být ve formě krému, emulze nebo oleje. Právě emulze patří mezi nejpoužívanější kosmetické přípravky. Pokud má emulze kapalný charakter, označujeme ji jako lotion (mléko). Krém je pak emulze vyskytující se v polotuhém stavu [2].

2.2 Emulze

IUPAC definuje emulze jako kapičky tekutiny nebo fluidní krystaly dispergované v kapalině. Dispergovaná fáze se označuje také jako vnitřní a vnější fáze jako kontinuální. Jestliže je vnitřní fáze lipofilní např. rostlinný olej nebo parafin dispergovaný v hydrofilním vodním prostředí, získáme emulzi typu oleje ve vodě o/v, v opačném případě pak emulzi vody v oleji v/o [2].

Emulze vykazují veškeré vlastnosti metastabilních koloidů jako je Brownův pohyb, vratný fázový přechod jako výsledek interakcí kapek a nevratný fázový přechod, který obecně zahrnuje jejich zničení [68].

2.2.1 Mechanismus emulzifikace

K vytvoření emulze je nutné mít jednotlivé složky, a to vodu, olej, surfaktant (povrchově aktivní látka) a energii. Velice důležitá je metoda, kterou použijeme na smíchání všech potřebných komponent. Pokud chceme vytvořit makroemulzi, tak stačí pouze použít k dispergaci vysokorychlostní míchadlo. Vytváření malých kapek je mnohem složitější a vyžaduje velké množství smáčedla nebo energie [69].

Pro získání emulze s kapkami o průměru v rozmezí 100–500 nm se používá ultrazvuk a vysokotlaký homogenizátor, jelikož obyčejné míchání neposkytuje požadovaný energetický efekt [69].

Přídavek emulgátoru hraje při formování emulzí zásadní roli tím, že snižuje mezifázové napětí. Emulgátory také pomáhají stabilizovat vzniklé emulze. Jak již bylo zmíněno výše, emulze jsou metastabilní systémy a jednotlivé fáze se snaží oddělit díky koalescenci např. pokud se jednotlivé kapky spojí. Tento proces je tedy možné zpomalit přídavkem vhodného surfaktantu [2].

Molekuly emulgátoru se adsorbují na povrchu olejových kapek během homogenizace a zajišťují ochranu membránu, která brání kapkám ve flokulaci a koalescenci [68]. Hydrofilní část emulgátoru je v kontaktu s vodní fází a lipofilní část je ve styku s lipofilní fází. Velké molekuly mohou svými lipofilními částmi zasahovat až do olejové fáze a tím ji stabilizovat.

Přídavek látek zvyšujících viskozitu dále zvyšuje stabilitu emulzí a také zlepšuje konzistenci [2].

2.2.2 Hydrofilně–lipofilní rovnováha

Okolo roku 1940 zavedla firma ICI Americans Inc. Systém HLB „Hydrophile–Lipophile Balance system“. Tento systém má za úkol zjednodušit přípravu emulzí tak, že pomůže přiřadit číslo k dané ingredienci či kombinaci ingrediencí, které mají tvořit olejovou fázi emulze a poté vybrat vhodný emulgátor nebo směs emulgátorů, jež mají stejné číslo [70]. HLB číslo emulgátoru vyjadřuje jeho hydrofilně-lipofilní rovnováhu, tedy rovnováhu mezi velikostí a silou hydrofilní (polární) části molekuly a lipofilní (nepolární) částí. [71]. Lipofilní emulgátor bude mít HLB číslo nižší než 9,0 a hydrofilní naopak vyšší než 11,0. Takové emulgátory, které mají HLB v rozmezí od 9–11, označujeme za střední [70]. Použití jednotlivých emulgátorů podle hodnot HLB je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3: Hodnoty HLB a použití příslušných emulgátorů. Převzato z [70]

Rozmezí HLB	Použití
4–6	Emulgátory pro emulze V/O
7–9	Smáčedla
9–18	Emulgátory pro emulze O/V
13–15	Detergenty
10–18	Solubilizátory

Před samotnou přípravou emulze je nutné si tedy promyslet, jaký typ emulze chceme připravit, a jaké složky budou v olejové fázi. Z těchto údajů si již podle tabulek můžeme procentuálním zastoupením vypočítat příslušné HLB číslo olejové fáze. V dalším kroku máme hned několik možností, a to buď najít emulgátor, který odpovídá vypočítané hodnotě HLB olejové fáze, nebo si vybrat dva emulgátory, jeden s nižší hodnotou HLB, než má olejová fáze a druhý s vyšší hodnotou HLB. Následuje opět výpočet, kdy si dopočítáme hmotností zastoupení jednotlivých emulgátorů, abychom získali požadovanou hodnotu HLB. Pro výpočet HLB olejové fáze tvořené několika složkami, tak i pro výpočet poměrů jednotlivých emulgátorů lze použít výpočet pomocí následujících rovnic. U emulgátorů si většinou vystačíme jen se dvěma složkami [70].

$$HLB_A \cdot w_A + HLB_B \cdot w_B + HLB_C \cdot w_C = HLB_{olej} \quad (4)$$

$$w_A + w_B + w_C = 1 \quad (5)$$

2.2.3 Suroviny použité na přípravu emulze O/V

Pro přípravu emulze O/V byla vybrána řada látek, jejichž popis a vliv na vlastnosti emulzí je uveden níže.

2.2.3.1 Glycerol (INCI Glycerin)

Je to průhledná, bezbarvá, hustá a hygroskopická kapalina bez zápachu. Je mísitelný s vodou a alkoholem, mírně rozpustný v acetonu a téměř nerozpustný v chloroformu a etheru. Běžně se využívá jako rozpouštědlo, změkčovadlo, sladidlo, lubrikant a konzervant. Glycerol je

využíván v kosmetických produktech již dlouhou dobu. Využívá se především jako humektant a pro své ochranné vlastnosti. Při hydrataci suché pokožky se využívá přídavek glycerolu až do 25 %. Dále také pravděpodobně reguluje fázové chování lipidů ve *stratum corneum* (SC) a zabráňuje tak krystalizaci jejich lamelární struktury in vitro při nízké relativní vlhkosti. Inkorporace glycerolu do modelové směsi lipidů z SC umožňuje lipidům zůstat v podobě kapalných krystalů i při nízké vlhkosti. Glycerol tedy ovlivňuje hydrataci SC a epidermální bariérovou funkci. Poprvé byl připraven v roce 1779 švédským vědcem C. W. Scheelem z hydrolyzovaného olivového oleje [2].

2.2.3.2 Germaben II (INCI Propylene Glycol (and) Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben)

Germaben II je průhledný, ve vodě rozpustný konzervační systém s vysokou viskozitou. Jeho aktivní složky jsou rozpuštěny v propylenglykolu, takže se snadno včlení do emulzí s obsahem olejové fáze do 25 %. Běžně je jeho přídavek v rozmezí 0,5–1 % [72].

2.2.3.3 Oleje

Nejhojněji využívaným příznivým účinkem kosmetických krémů je zvýšení hydratace pokožky. Vše začíná u faktu, že voda je jediná sloučenina, která dokáže změkčit horní mrtvé vrstvy epidermis a dodat jim tak opět požadovaný vzhled měkké a jemné pokožky. Pokud dochází k rychlým ztrátám vody, a ty nejsou dostatečně kompenzovány přísunem vody z nižších vrstev epidermis, pokožka se stává dehydratovanou a ztrácí pružnost. Pro obnovení pružnosti pokožky jsou využívány emulze oleje a vody. Běžně se pro vyřešení toho problému používají kosmetické přípravky na bázi ropy (např. parafinový olej, vazelína). Možnou alternativou k parafinovému oleji mohou být oleje rostlinné. Zjištění, že pH pokožky je kyselé, podpořilo využití rostlinných olejů v kosmetice. Mají také kyselý charakter, a jsou snadno biodegradovány a více kompatibilní s lipidy pokožky než parafinový olej. Také mohou působit jako zvlhčující, změkčující a okluzní materiály, které pomáhají obnovit hydrataci pokožky [73].

2.2.3.4 Cetylalkohol

Cetylalkohol je organický alkohol s dlouhým řetězcem, který se využívá jako povrchově aktivní látka, zahušťovadlo, stabilizátor a zmatňující látka. Může mít rostlinný i živočišný původ [74].

2.2.3.5 Dimethikon

Polydimethyl siloxany, také nazývané dimethikonu, jsou nerozpustné ve vodě nebo v roztoku tenzidů. Mají lineární strukturu o molekulové hmotnosti 700–100 000. Pro přípravu emulzí s těmito nepolárními nerozpustnými silikony je nutná emulzifikace za tepla a vhodný stabilizátor emulze. V kosmetickém průmyslu jsou silikony využívány od 50. let dvacátého století. Dnes jsou obsaženy téměř ve více než 40 % nových produktů přivedených na trh v USA [2].

2.2.3.6 Emulgátory

Emulgátory jsou látky, které se při přípravě emulzí přidávají pro docílení stability tohoto systému. Stejně tak jako složky olejové fáze mají i emulgátory své HLB číslo, podle něhož

jsou vybírány k danému složení olejové fáze. Ercawax BM1 je emulgátor složený z cetarethu-20 a jeho HLB je $15,2 \pm 1$. Často používaným emulgátorem byl lecithin s HLB $9,7 \pm 1$. Emulgátory je možné kombinovat stejně tak jako lze modifikovat složení olejové fáze. Můžeme tak dosáhnout hodnoty HLB shodující se s hodnotou pro olejovou fázi. Celkový přírůstek emulgátorů se pohybuje okolo 2 % [71].

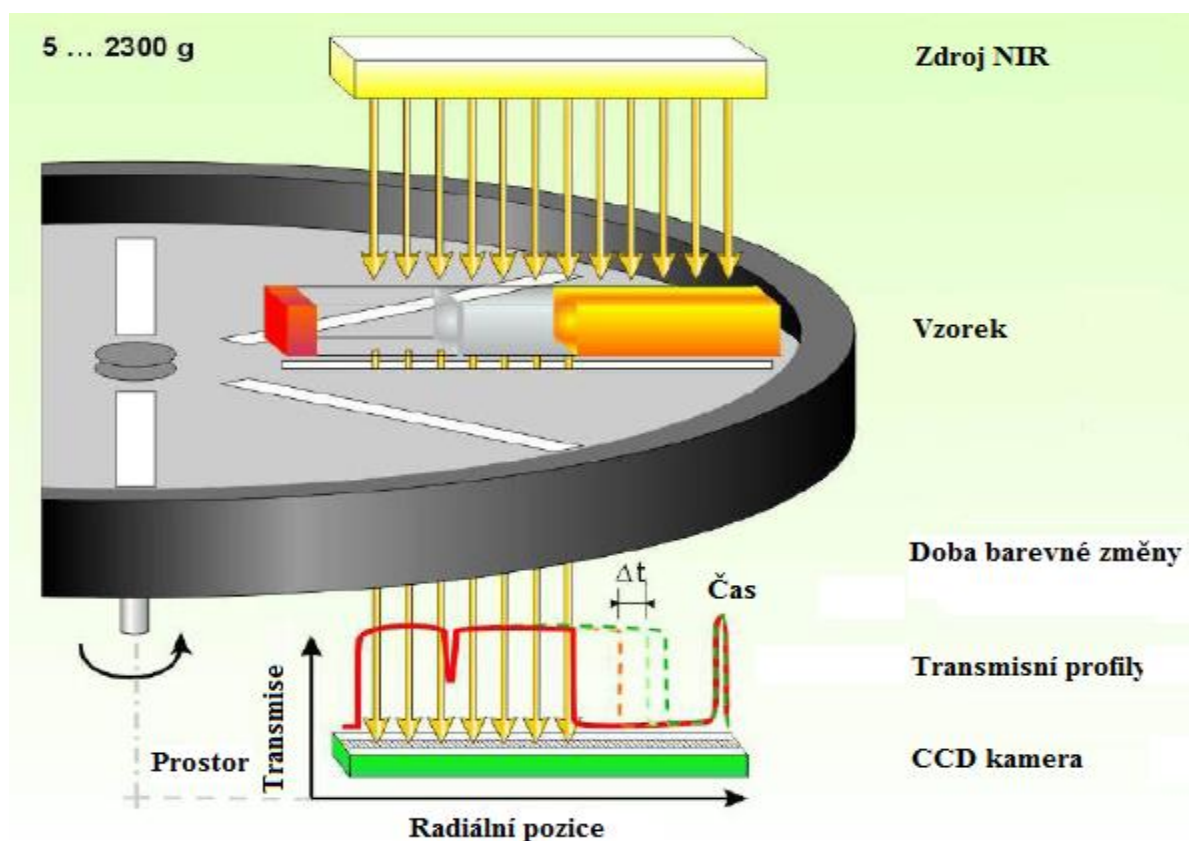
2.2.4 Analýza emulzí pomocí analytické centrifugace

Jedním z hlavních důvodů koloidní nestability emulzí, obecně označovaných jako sedimentace, je separace fází podle měrných hmotností. Jedná se o proces, při kterém dochází vlivem působení hmotnostní (objemové) síly vyvolané gravitačním zrychlením k oddělení dispergovaných částic od disperzního prostředí. Směr usazování závisí na rozdílu hustot, kdy částice s vyšší hustotou, než disperzní prostředí se pohybují ve směru gravitačního zrychlení a částice s nižší hustotou proti němu. Proto v případě emulze tuku ve vodě hovoříme o vyvstávání tuku. Rychlost pohybu částice v_u při pomalém usazování, kdy je hodnota Reynoldsova kritéria pro usazování $Re_u < 0,2$ (obvyklé pro malé částice), vyjadřujeme pomocí Stokesova vztahu. Jelikož je usazování v gravitačním poli obvykle relativně pomalé, je vhodné pro účely hodnocení sedimentační stability proces separace fází urychlit tak, že gravitační zrychlení nahradíme zrychlením odstředivým. Často se pro vyjádření odstředivého zrychlení používá relativní násobek tíhového zrychlení.

$$a_g = \frac{r \cdot \omega^2}{9,81} \quad (6)$$

Ze závislosti rychlosti usazování na odstředivém zrychlení lze pak extrapolací odhadnout rychlost separace fází při skladování v gravitačním poli. Za předpokladu lineární závislosti pak k tomuto odhadu postačí pouze jeden údaj o rychlosti sedimentace při působení zvoleného odstředivého zrychlení [75].

Pomocí analytické centrifugy tedy můžeme charakterizovat sedimentující částice, jejich molekulové hmotnosti, sedimentační koeficient a další hydrodynamické vlastnosti (difuzní koeficient). Z naměřených dat získáváme informace o přibližné velikosti a tvaru částic, údaje o distribuci jednotlivých typů částic ve vzorku a můžeme také sledovat rovnovážné systémy a určit jejich rovnovážné konstanty [76].



Obr. 7: Schéma analytické centrifugy převzato a upraveno [75].

LUMisizer je temperovaná odstředivka, která umožňuje fotometrické sledování změn koncentrace dispergovaných látek ve vzorku, vyvolaných působením odstředivé síly. Vzorky jsou umístěny v kyvetách, ve kterých je ve zvoleném intervalu sledován profil transmitance NIR záření [75].

Sedimentace dispergovaných částic se projeví vyčerením části vzorku, tedy zvýšením transmitance a tvorbou sedimentu, tedy snížením transmitance [75]. Obr. 7 znázorňuje schéma analytické centrifugy, princip měření a výsledný graf.

3 CÍLE PRÁCE

Předložená práce je zaměřená na vývoj vhodných typů polymerních částic a jejich využití pro enkapsulaci vybraných přírodních UV filtrů. Připravené materiály budou testovány pro využití v ochranných kosmetických přípravcích.

V rámci této diplomové práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. výběr polymerních materiálů a přírodních UV filtrů
2. charakterizace materiálů a jejich složek
3. testování biologických účinků připravených materiálů
4. využití připravených materiálů jako složek kosmetických přípravků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Aceton – LachNer (ČR)
Antibiotic-Antomycotic 100X(Biosera), Biotech (SRN)
 β -karoten 95 % typ I: syntetický – Sigma (SRN)
Cetylalkohol (Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
2,6-dichlorindofenol – Sigma-Aldrich (SRN)
Diethyl ether>99% – VWR (USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. – Vitrum-LachNer (ČR)
DL- α -tokoferol acetát – MERCK (SRN)
Dodecylsíran sodný – Serva (SRN)
Ethanol pro UV-spektroskopii – LachNer (ČR)
Eusolex® 2292 – MERCK (SRN)
Eusolex® 9020 – MERCK (SRN)
FBS fetální bovinní sérum – HyClone (USA)
Germaben II – International Specialty Products (New Jersey, USA)
Glycerin bezvodý p.a. – LachNer (ČR)
Chlorid sodný p.a. – Vitrum-LachNer (ČR)
Chloroform pro HPLC – LachNer (ČR)
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu – Serva (SRN)
Lecithin from soy bean – Serva (SRN)
Médium KGM Gold Single Quods – Lonza, (SWI)
Methanol pro HPLC, Gradient Grade – Sigma (SRN)
MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) – Duchefa Biochemie (NL)
PHB Lot 720 – Biomer (SRN)
Trypsin - Versene EDTA – P-Lab (ČR)

4.2 Kosmetické preparáty

Astrid olej SPF 15 (ČR)
Avokádový olej – 1. Aromaterapeutická KH a.s. aromaterapie Karel Hádek, Stříbro, (ČR)
Bioderma Matifying fluid SPF 30 (FR)
Dimetikon 350 cs – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
Ercawax MB1 – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
Jojobový olej – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
Kokosový olej – Purity vision (ČR)
Konopný olej – Netuwee (ČR)
Makadamiový olej – 1. Aromaterapeutická KH a.s. aromaterapie Karel Hádek, Stříbro, (ČR)
Mandlový olej – 1. Aromaterapeutická KH a.s. aromaterapie Karel Hádek, Stříbro, (ČR)
Olivový olej – Alnatura (SRN)
Parařinový olej (Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)
Palmový olej – Fabio produkt spol. s.r.o., (SRN)
Ricinový olej – 1. Aromaterapeutická KH a.s. aromaterapie Karel Hádek, Stříbro, (ČR)
SunDance olej SPF 6 –,DM-drogeriemarkt (SRN)

Uriage krém SPF 30+ (FR)

Vazelina bílá – Míča a Harašta s.r.o., Blansko, (ČR)

4.3 Použité přístroje

Analytické váhy (AND HR-120)

CellCulture CO2 Inkubátor, ESCO (SRN)

Centrifuga – U-32-R, Boeco (SRN)

ELISA ReaderBio Tek ELx808

IMPLEN Nanophotometer UV-VIS (SRN)

Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)

Laminární box Aura mini, Bioair

LUMiSizer – Dispersion analyzer – Lum (USA)

Magnetická míchačka: Lavat (ČR)

Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen

Mikroskop – Intraco Micro (ČR)

Optický mikroskop a software DinoCapture

Sestava HPLC

- Termostat – Ecom spol s.r.o.LCO 10126

- Pumpa – Finnigan Surveyor MS Pump Plus

- Kolona Eclipse plus XDB-C18, 5µm, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies – USA)

- Detektor – Finnigan Surveyor PDA Plus detektor

Sestava pro elektrospinning

- NE-1000 Single Syringe Pump, Labicom (ČR)

- Regulovatelný zdroj napětí

Spektrofotometr – Helios γ, Unicam (VB)

Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)

Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Sonopuls, Bandelin (SRN)

Vakuová odparka – HB4 Basic, HBA Labortechnik (SRN)

Vortex – Genius 3, IKA Vortex (SRN)

ZetaSizer Nano ZS – Malvern (VB)

4.4 Použité organismy

HEK (102-105a) - Cryopreserved Epidermal Keratinocytes;, adult;, firma Culture Collections, Public Health England

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-26

Chlorella vulgaris CCALA 924

4.5 Optimalizace extrakce lipofilních látek z přírodních zdrojů

Nejprve byla provedena optimalizace extrakce lipidových podílů z vybraných druhů zeleniny, a to papriky a špenátu, jakožto reprezentantů všech ostatních druhů zeleniny a z vybraných mikroorganismů. Byla porovnávána extrakce dle Folche a extrakce pomocí dalších rozpouštědel, které byly vybrány dle literatury, a to aceton, DMSO a ethylacetát [20], [77]. Při těchto extrakcích bylo jako kontroly použito i extrakce dle Folche, tedy směsi chloroform:methanol v poměru 2:1 (v:v). Vždy bylo použito 30 g vzorku a 60 ml extrakčního činidla.

4.5.1 Extrakce dle Folche

Metoda je dimenzována na 1 g vzorku, kdy celkový objem rozpouštědel činí 30 ml, tedy třicetinasobek původního objemu. Primárně tato metoda však slouží k extrakci lipofilních látek z tkání jako je svalová, jaterní a nervová, které obsahují vysoký podíl lipofilních látek [35], [78].

Poměr extrakčního činidla a hmotnosti vzorku pro extrakci lipofilních látek ze zeleniny, kvasinek a řasy byl modifikován s ohledem na obsah lipofilních látek, který je u většiny vzorků desetkrát menší než u masa z lososa. Proto byl poměr hmotnosti homogenizovaného vzorku v gramech ku objemu extrakčního činidla pozměněn na 1:2.

Vzorky zeleniny byl homogenizovány a poté byl homogenizát míchán s extrakční směsí při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Poté byl extrakt přefiltrován přes skládaný filtr. Vzorek z filtru byl převeden zpět do Erlenmeyerovy baňky a smíchán se polovičním množstvím extrakční směsi než v prvním kroku a míchán opět při laboratorní teplotě 30 minut. Extrakty z obou kroků byly smíchány a byl k nim přidán 1,2-násobek objemu destilované vody a takto připravená směs byla přelita do centrifugačních kyvet a centrifugována 5 minut při 1 000 otáčkách za minutu. V kyvetách se vytvořily dvě fáze, vrchní převážně vodná a spodní převážně chloroformová. Vodná fáze byla opatrně odstraněna. Zbylá chloroformová fáze byla překapána přes bezvodý síran sodný přímo do zvážené baňky s kulatým dnem a následně odpařena na vakuové rotační odparce při 40 °C. Vyextrahované lipidy byly rozpuštěny v nezbytném množství chloroformu, převedeny do 5 ml lékovek. K polovině extraktu byl navíc pro stabilizaci přidán α - tokoferol acetát. Z takto připravených roztoků bylo odpipetováno 5·100 μ l do zkumavek typu Eppendorf a chloroform byl ponechán volně odpařovat v digestoři. Po odpaření chloroformu byly veškeré vzorky uchovávány při -18 °C.

Stejný postup byl proveden pro veškeré vzorky zeleniny (rajče, mrkev, paprika, špenát avokádo), dále mikrořasy *Chlorella vulgaris* a kvasinky *Rhodotoruay glutinis*.

4.6 Analýza extraktu lipofilních látek

K porovnání různých postupů extrakce byla použita kapalinová chromatografie s UV–VIS detektorem, dále spektrofotometrické stanovení a vážková metoda.

4.6.1 Obsah aktivních látek stanovení pomocí HPLC

Zastoupení aktivních látek v jednotlivých extraktech bylo stanoveno metodou HPLC pomocí sestavy pro kapalinovou chromatografii od firmy Thermo Fisher Scientific a k vyhodnocení byl použit software Xcalibur. Odpařený extrakt byl rozpuštěn v chloroformu chromatografické kvality, zfiltrován pře filtr 450 nm a převeden do zkumavky typu

Eppendorf. Vzorek byl dávkován dávkovací smyčkou o objemu 20 μl . Podmínky analýzy byly nastaveny na teplotu 45 $^{\circ}\text{C}$, průtok 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, mobilní fáze byla acetonitl:methanol:chloroform v poměru 80:15:5 a kolona Eclipse plus XDB-C18. Detekce byla prováděna při absorpčních maximech jednotlivých analyzovaných látek (285 nm pro ubichinon, ergosterol a α -tokoferol acetát, 450 nm pro karotenoidy). Získaná data byla zpracována a vyhodnocena na základě porovnání se standardy α -tokoferol acetátu, β -karotenu, ergosterolu a ubichinonu. Kromě těchto molekul byla stanovována i celková koncentrace karotenoidů. Pro toto stanovení byla z důvodu komerční nedostupnosti a finanční náročnosti jednotlivých standardů karotenoidů použita kalibrační křivka pro β -karoten, jelikož jsou si jednotlivé struktury karotenoidů podobné a jejich absorpční maxima se pohybují okolo 450 nm viz Obr. 2.

4.6.2 Měření UV–VIS spekter pomocí nanofotometru

Pro jednotlivé vzorky bylo vždy změřeno absorpční spektrum při vlnové délce 290–800 nm. Pokud bylo nutné, byl nejprve ze vzorků odpařen chloroform, poté byly vzorky naředěny ethanolem na koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a proměřeny proti blanku (ethanol).

Při porovnávání různých extrakčních rozpouštědel byly vzorky naředěny desetkrát a proměřeny proti blanku (ethanol). Z takto získaných spekter bylo možné dále vypočítat SPF a obsah karotenoidů.

4.6.2.1 Výpočet SPF

Pro výpočet SPF byly vzorky nejprve naředěny ethanolem na koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a poté z naměřených spekter vybrány hodnoty absorbance pro hodnoty vlnové délky v rozmezí 290–320 nm s krokem 5 nm. Tyto hodnoty byly použity pro výpočet SPF dle Mansurovy rovnice (viz kapitola 2.7).

4.6.2.2 Stanovení celkových karotenoidů

Z naměřených spekter byl dále vypočítán celkový obsah karotenoidů. Nejprve byla připravena kalibrace obsahu karotenoidů, jako závislost absorbance při 450 nm na koncentraci standardu β -karotenu. Koncentrace karotenoidů ve vzorku byla vypočítána dle následující rovnice kalibrační křivky, kdy koncentrace je uvedena v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

$$A = 4,724 \cdot c - 0,158 \quad (7)$$

$$R^2 = 0,990 \quad 1$$

4.7 Příprava liposomů metodou sonikace

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky lecithinu a cholesterolu v chloroformu. Ze zásobního roztoku lecithinu bylo pipetováno množství odpovídající 70 mg a ze zásobního roztoku cholesterolu množství odpovídající 10 mg cholesterolu do kádinky s 10 ml destilované vody. Takto připravený vzorek byl sonikován tyčovým ultrazvukem po dobu 4·15 sekund a chlazen vodou. Po sonikaci byla kádinka se vzorkem dána na magnetickou míchačku s ohřevem, kdy bylo docíleno odpaření chloroformu při 40 $^{\circ}\text{C}$.

4.8 Liposomy s přidavkem aktivních látek

Při přípravě liposomů s přidavkem aktivních látek byl k roztokům lecithinu a cholesterolu v chloroformu přidán extrakt z rajčete, mrkve, papriky, špenátu, avokáda, kvasinky *Rhodotorula glutinis* a řasy *Chlorella vulgaris*.

4.9 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena u vzorků částic s příslušnými extrakty, jako podíl koncentrace enkapsulované látky k původní koncentraci ve vzorku.

$$EU = \frac{C_{\text{aktivní látky v liposomech}}}{C_{\text{celková aktivní látky}}} \cdot 100 \% = \frac{C_{\text{aktivní látky v liposomech}}}{C_{\text{aktivní látky v liposomech}} + C_{\text{aktivní látky v roztoku}}} \cdot 100 \% \quad (8)$$

Obsah karotenoidů byl stanoven pomocí metody popsané v kapitole 4.6.2.2 a následně vypočítána enkapsulační účinnost pomocí výše uvedeného vzorce.

4.10 Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta-potenciálu

Vzorky klasických liposomů, liposomů s přidavkem lipidového extraktu z rajčete, mrkve, papriky, špenátu, avokáda, kvasinky *Rhodotorula glutinis* a řasy *Chlorella vulgaris* a kombinované liposomy připravené pomocí ultrazvuku byly vhodně zředěny destilovanou vodou a proměřena jejich velikost a koloidní stabilita pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Stejný postup byl u výše uvedených vzorků ještě opakován v časovém horizontu jednoho týdne a jednoho měsíce, kdy byla pozorována dlouhodobá stabilita. Dále byly vzorky samotných liposomů vystaveny teplotě 80 °C po dobu 1,5 hod. V tomto případě byla sledována vhodnost částic pro přípravu emulzí, kdy jsou jednotlivé složky temperovány na 80 °C.

4.11 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity byla zvolena metoda TEAC s využitím ABTS radikálu, jejíž princip je popsán v kapitole 2.15.4. Nejprve byl připraven roztok radikálového kationu $\text{ABTS}^{\bullet+}$ smícháním 7 mM roztoku ABTS a 2,45 mM roztokem peroxosíranu draselného. Takto připravený roztok byl ponechán 12 hod ve tmě. Před samotným měřením byl takto připravený roztok činidla zředěn ethanolem pro UV–VIS spektrofotometrii na absorbanci 0,70, při $\lambda = 734 \text{ nm}$. Jakožto blank byl použit ethanol pro UV–VIS spektrofotometrii.

Standardem metody byl roztok Troloxu, který byl rozpuštěn v 60 % ethanolu. Postup měření byl následující. Do zúžené kyvety byl pipetován 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 10 μl vzorku. Vzorky byly proměřeny v čas $t = 0 \text{ s}$, poté byly uchovávány 10 min ve tmě a jejich absorbance opět proměřena v čas $t = 10 \text{ min}$. Veškerá naměřená data byla vyhodnocena jako změna absorbance v čas t_0 a čas t_{10} . Kalibrační rovnice:

$$\begin{aligned} y &= 0,00132x \\ R^2 &= 0,99113 \end{aligned} \quad (9)$$

4.12 Stanovení koncentrace fosfolipidů v liposomech

Nejprve byl připraven roztok činidla rozpuštěním 2,7 g hexahydrátu chloridu železitého a 3,05 g thiokyanatanu amonného ve 100 ml destilované vody. Do centrifugačních zkumavek bylo pipetováno 50 μ l vzorku, 450 μ l destilované vody, 2 ml roztoku činidla a 3 ml chloroformu. Následně byl vzorek 20 s promícháván pomocí vortexu. Poté byly vzorky centrifugovány při 1 000 rpm po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly měřeny na spektrofotometru při $\lambda = 450$ nm. Jako blank byl použit chloroform. Obsah fosfolipidů ve vzorku byl vypočítán pomocí kalibrační křivky pro sójový lecithin.

4.13 Stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu

Pro studování cytotoxicity byly vybrány lidské keratinocyty, jelikož sledované roztoky částic by mohly najít své uplatnění v kosmetice, jako složky prostředků na opalování. Testovány byly vybrané druhy částic v rozmezí koncentrací 2–14 %. Postup byl převzat z [79] a upraven.

Buňky byly nejprve kultivovány na 96–jamkových destičkách s plochým dnem. Hustota buněk byla $2-5 \cdot 10^5$ na ml, kdy do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l buněčné kultury a ta ponechána růst po dobu 16 až 24 hod v kultivačním médiu.

Testované roztoky částic byly nejdříve zředěny 1:1 destilovanou vodou, poté přefiltrovány přes sterilní filtr (200 nm) a dále ředěny na koncentrace 2–14 % kultivačním médiem. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l, takto připravené řady vzorků. Jako kontrola sloužilo kultivační médium („CC – cell control“), dále jako pozitivní kontrola byl použit ethanol. Cytotoxický efekt na buňky byl měřen po 24 hod kultivace.

MTT bylo rozpuštěno pro dosažení koncentrace $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ PBS a sterilizováno filtrací a do každé jamky bylo přidáno 20 μ l. Destičky byly kultivovány po dobu 3 hod. Pro zvýšení rozpustnosti tmavě fialových krystalů formazanu bylo přidáno vždy 100 μ l 10% SDS v PBS (pH 5,5). Destičky byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě a test byl vyhodnocen spektrofotometricky druhý den při $\lambda = 543$ nm. Pro vyhodnocení byly tyto hodnoty absorbance porovnávány s absorbancí blanku (kultivačním médiem). Pokud by absorbance vzorku klesla pod 50 % kontroly, daný vzorek by byl cytotoxický.

4.14 Příprava kosmetických emulzí

Pro vytvoření vhodných emulzí byla nejprve nutná optimalizace a testování řady komponent s ohledem na SPF a celkové porovnání absorbancí jednotlivých složek v UVA, a především v UVB oblasti.

4.14.1 Porovnávání absorbance v UVB oblasti a stanovení SPF

Pro přípravu emulzí byla nejprve porovnávána UV absorbance a SPF různých komerčně dostupných olejů, dále připravených extraktů ze zeleniny, *Rhodotorula glutinis* a *Chlorella vulgaris* a vzorků všech částic.

Vzorky olejů byly rozpuštěny v ethanolu a 5 min sonikovány, poté byly vzorky dále ředěny ethanolem na vhodnou koncentraci. Následně byla proměřena absorbance v rozsahu 290–700 nm. Jako blank byl použit ethanol. Pro výpočet SPF byly použity hodnoty 290–320 nm s krokem 5 nm. Výpočet byl proveden dle Mansurovy rovnice popsané v kapitole 2.7. Se vzorky extraktů bylo postupováno stejně jako v případě komerčních olejů.

Vzorky liposomů byly nejprve desetkrát naředěny ethanolem a sonikovány 5 min. Poté byla proměřena jejich absorbance při $\lambda = 290\text{--}700\text{ nm}$. Pro výpočet SPF byl proveden stejný postup výpočtu jako se vzorky olejů a extraktů.

4.14.2 Příprava emulze O/V

Příprava emulzního základu O/V se řídí principem vytvoření stálé homogenní směsi vodné a tukové fáze. Příprava emulzních základů byla prováděna v laboratoři při laboratorní teplotě. Nejprve je nutné připravit zvlášť vodní a olejovou fázi. Následující postup byl použit pro přípravu 100 ml emulze.

Při přípravě vodní fáze bylo do kádinky odměřeno 84,0 ml destilované vody, 3,0 ml 86,5 % glycerolu (2,6 ml 100 % glycerolu a 0,4 ml destilované vody) a 0,5 ml germabenu II. Celá směs byla zahřívána na teplotu 75–80 °C.

Pro přípravu olejové fáze bylo do kádinky naváženo 2,5 g Ercawax BM1, 3,0 g cetylalkoholu, 1,5 g bílé vazelíny a napipetováno 4,0 ml parařinového oleje a 1,5 ml dimethikonu. Vzniklá směs byla opět za stálého míchání zahřívána na teplotu 75–8 °C. Jakmile měly obě fáze teplotu 75 °C, byla do vodné fáze za stálého míchání postupně přidána fáze olejová. Během procesu míchání byla směs chlazená na vodní lázni. Po emulgaci byla vzniklá směs intenzivně míchána až do vychladnutí na 20 °C.

Složení této základní emulze bylo dále optimalizováno a modifikováno pro dosažení co možná nejlepších výsledků. Nejprve bylo optimalizováno složení olejové fáze, pro docílení zvýšení absorbance v UV oblasti. Byla proměřena UV–VIS absorpční spektra pro řadu komerčně dostupných olejů. Ty byly opět proměřeny dle metody popsané v kapitole 4.6.2.1. Modifikace jednotlivých fází jsou zobrazeny v Tab. 4.

Tab. 4: Modifikace původního složení emulzí. ME – extrakt z mrkve s vitamínem E, PHB – polyhydroxybutyrát, RGCH – extrakt z *Rhodotorula glutinis* a *Chlorella vulgaris*

vzorek	modifikace vodní fáze		modifikace olejové fáze	
	aktivní látka	množství	aktivní látka	množství
A	–	–	konopný olej (náhrada parařinového oleje)	0,61 g
B	–	–	konopný olej (náhrada parařinového oleje a dimethikonu)	1,29 g
C	extrakt z papriky	0,62 mg	–	–
D	extrakt z papriky	1,1 mg	–	–
E	extrakt z papriky	3 mg	–	–
F	liposomy ME	6 ml konc.	–	–
G	liposomy PHB	5 ml	extrakt <i>Rhodotorula glutinis</i> s vit. E	6,3 mg
	liposomy RGCH	10 ml konc.	extrakt <i>Chlorella vulgaris</i> s vit. E	3,9 mg
H	liposomy PHB	5 ml	konopný olej	1,3 g
	liposomy RGCH	10 ml konc.	extrakt <i>Rhodotorula glutinis</i> s vit. E	10,0 mg
			extrakt <i>Chlorella vulgaris</i> s vit. E	3,7 mg
I	liposomy PHB	5 ml	extrakt <i>Rhodotorula glutinis</i> s vit. E	6,0 mg
			extrakt <i>Chlorella vulgaris</i> s vit. E	6,5 mg
	liposomy RGCH	10 ml konc.	konopný olej	1,3 g
			lecithin	0,66 g

4.14.2.1 Stanovení SPF in vitro emulzí

Nejprve byly proměřeny vzorky komerčně dostupných krémů s UV protektivním účinkem tak, že byly vhodně zředěny v ethanolu, sonikovány 5 minut ve vanovém ultrazvuku ethanolu a změřena jejich absorbance na UV–VIS spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 290–320 nm s krokem 5 nm dle metody popsané výše v kapitole 2.7. Následně byl stejný postup použit i pro vzorky všech připravených emulzí.

4.14.3 Stanovení vlastností systémů pomocí analytické centrifugace

Vybrané vzorky připravených emulzí byly analyzovány pomocí analytické centrifugy, a tím byla zjištěna jejich dlouhodobá stabilita. Přístroj byl nastaven na 2 210 g, po dobu 200 min.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Extrakce lipidových podílů ze vzorků

Pro extrakci lipidového podílu byly vybrány vzorky rajčete, mrkve, papriky, špenátu, kvasinky *Rhodotorula glutinis* a řasy *Chlorella vulgaris*.

5.1.1 Vážkové stanovení obsahu sušiny

Před samotným extrakčním krokem bylo nutné vzorky homogenizovat a stanovit obsah sušiny. Výsledky tohoto stanovení jsou zobrazeny v Tab. 5.

Tab. 5: Procentuální obsah sušiny ve sledovaných vzorcích. Pro vzorky *Rhodotorula glutinis* a *Chlorella vulgaris* jsou obsahy sušiny uvedeny v jednotkách $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ média.

vzorek	sušina [hm %], * $[\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$
rajče	$6,54 \pm 0,18$
mrkev	$12,27 \pm 0,14$
paprika	$9,19 \pm 0,19$
špenát	$7,99 \pm 0,43$
<i>Rhodotorula glutinis</i> *	$6,13 \pm 0,27$
<i>Chlorella vulgaris</i> *	$2,22 \pm 0,01$

Z těchto výsledků vidíme, že vzorky rajčete, papriky a špenátu jsou si co do obsahu sušiny relativně podobné a obsahují okolo 8 % sušiny. Mrkev obsahovala nejvíce sušiny 12,27 %. Z posledních dvou vzorků byl obsah sušiny vyšší pro kvasinku *Rhodotorula glutinis* s $6,13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kultury. Mikrořasa *Chlorella vulgaris* obsahovala třetinové množství sušiny.

5.1.2 Optimalizace extrakčního kroku

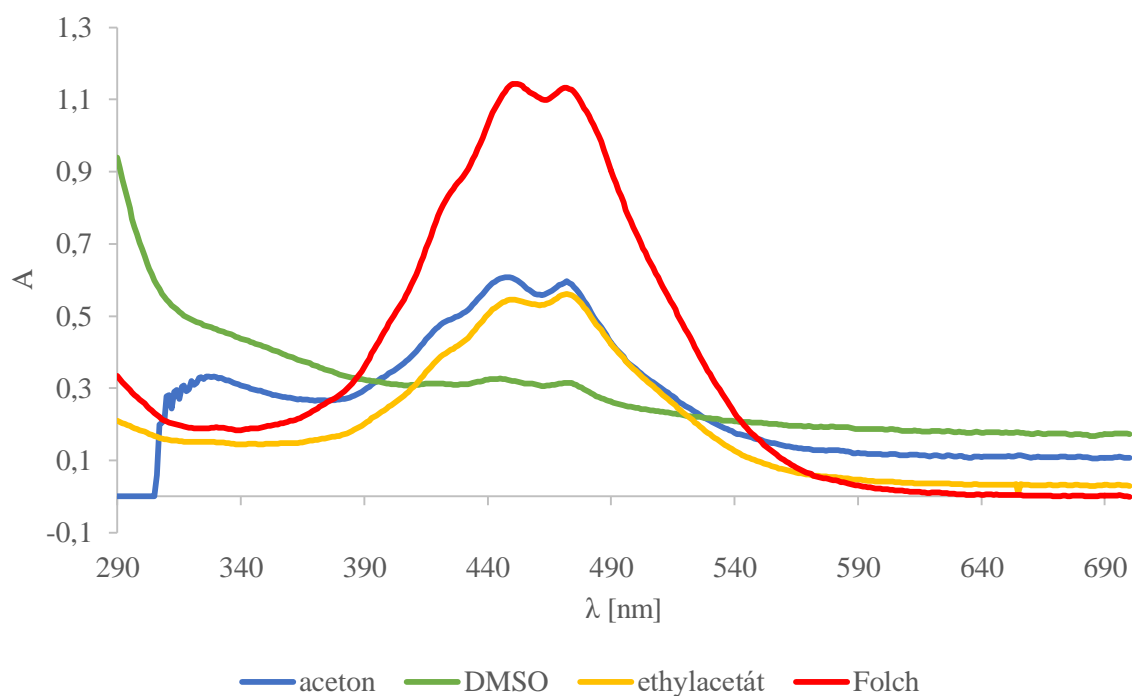
Pro optimalizaci extrakce byla vybrána série čtyř extrakčních rozpouštědel, které byly nejprve otestovány na vzorku papriky a špenátu. Vzorky po extrakci byly vhodně naředěny a byla u nich proměřena UV–VIS spektra (viz Obr. 8 a Obr. 9) a ta následně porovnávána. Dále byl ze spekter vypočítán obsah β -karotenu (karotenoidů) dle rovnice kalibrační křivky viz kapitola 4.6.2.2. Výsledné koncentrace karotenoidů po extrakci jsou pro vzorky papriky uvedeny v Tab. 6 a pro vzorky špenátu v Tab. 7.

Z naměřených dat pro vzorek papriky vyplývá, že karotenoidy se nejlépe extrahovaly do směsi chloroformu a methanolu 2:1, tedy při extrakci dle Folche. Obsah karotenoidů byl stanoven na $2,75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Druhým nejlepším rozpouštědlem byl aceton, zde se však extrahovalo $1,64 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, což odpovídá téměř polovičnímu množství.

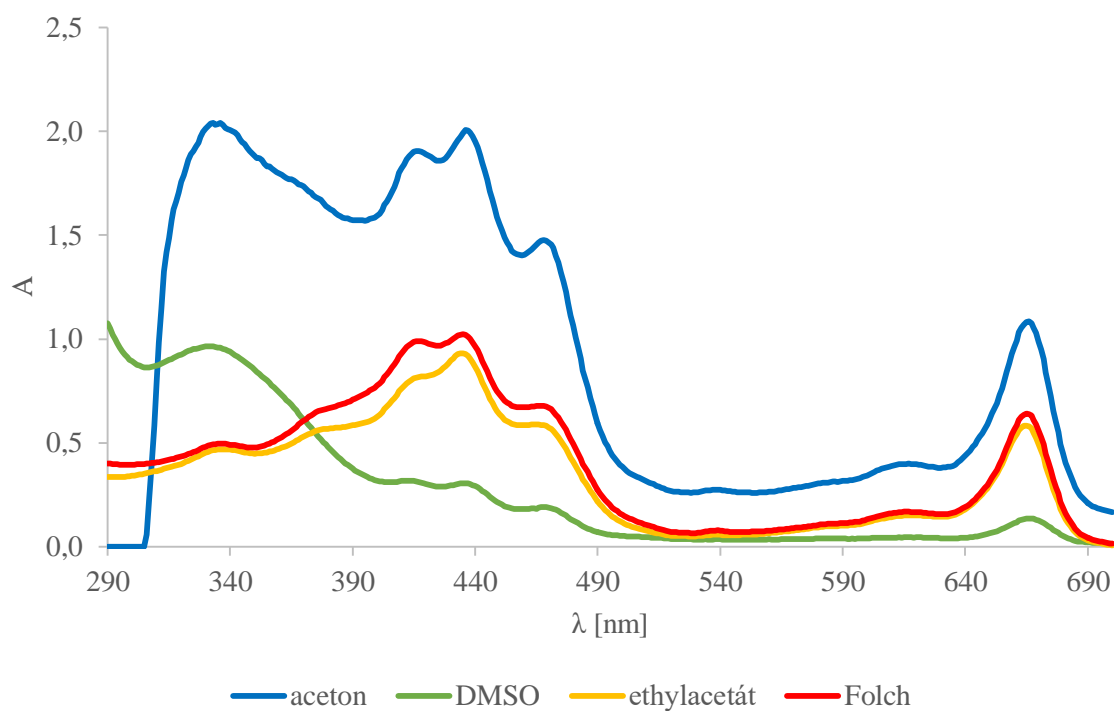
Tab. 6: Obsah karotenoidů v extraktech připravených z papriky

Extrakční činidlo	A	c $[\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$
aceton	0,503	$1,40 \pm 0,02$
DMSO	0,175	$0,58 \pm 0,14$
ethylacetát	0,545	$1,49 \pm 0,08$
metoda dle Folche	1,143	$2,75 \pm 0,15$

Jako druhý byl analyzován vzorek špenátu. Zde byl nejlepším rozpouštědlem aceton s dosaženým výtěžkem karotenoidů $3,65 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a jako druhou nejlepší extrakční směs dle Folche o koncentraci $1,89 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.



Obr. 8: Absorpční UV–VIS spektrum pro vzorky extraktů z papriky



Obr. 9: Absorpční UV–VIS spektrum pro vzorky extraktů ze špenátu

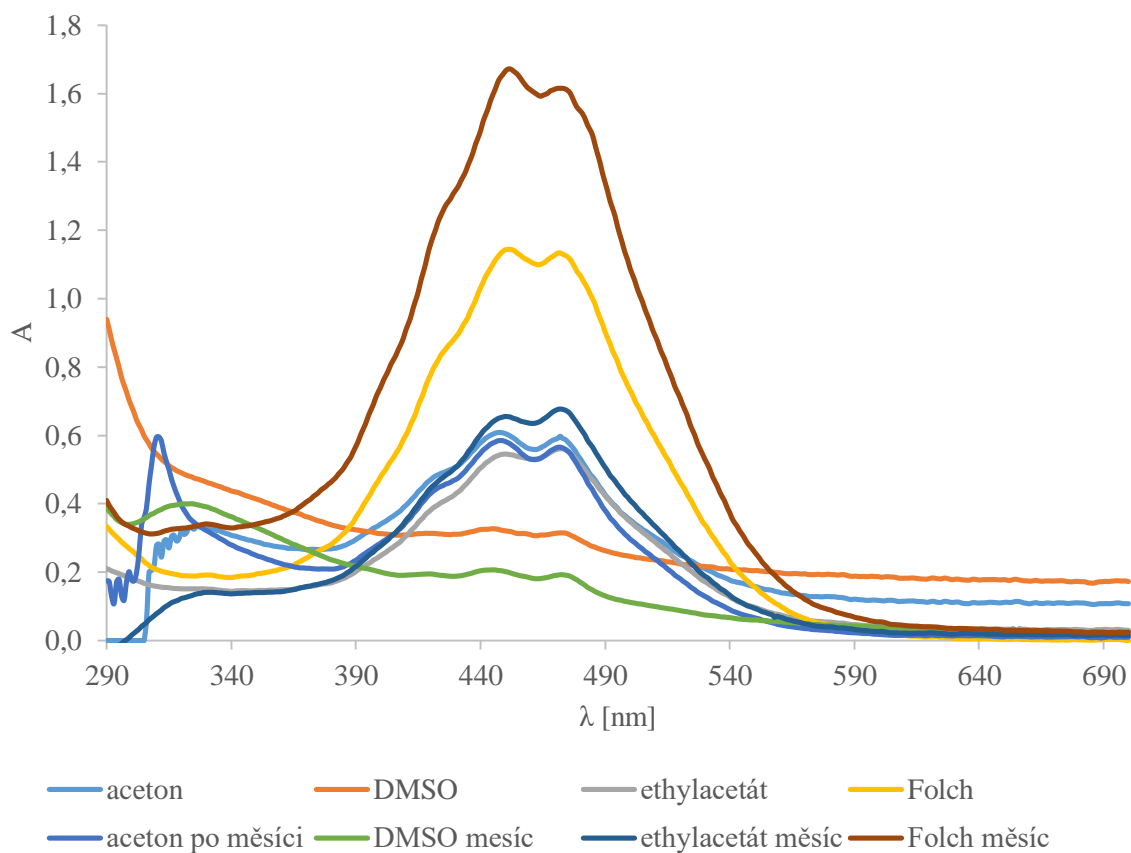
Tab. 7: Obsah karotenoidů v extraktech připravených ze špenátu

Extrakční činidlo	A	c [mg·ml ⁻¹]
aceton	1,513	3,54 ± 0,29
DMSO	0,209	0,78 ± 0,17
ethylacetát	0,639	1,69 ± 0,11
Folch	0,733	1,89 ± 0,10

Jelikož bylo pro extrakci nutné vybrat pouze jediný postup, bylo po shrnutí těchto dat dosaženo závěru, že jako hlavní extrakční postup bude dále využíván postup dle Folche. Pro vzorek papriky vychází tento postup jako neúčinnější. Pro vzorek špenátu byla extrakce dle Folche až druhá nejlepší, jako nejlepší extrakční činidlo byl vyhodnocen aceton. Extrakce dle Folche má však standardizovaný postup, který je v laboratoři dlouhodobě zaveden a jeho použití i pro vzorek špenátu se jeví stále jako vhodné.

5.1.3 Sledování stability extraktů v průběhu uchovávání

U stejných vzorků byla dále sledována vhodnost daného rozpouštědla pro uchovávání po dobu jednoho měsíce. Naměřená data a jejich porovnání s daty naměřenými u čerstvých vzorků jsou zobrazena na Obr. 10 a Obr. 11. Z těchto naměřených hodnot byly vypočítány koncentrace karotenoidů, které jsou zobrazeny v Tab. 8.



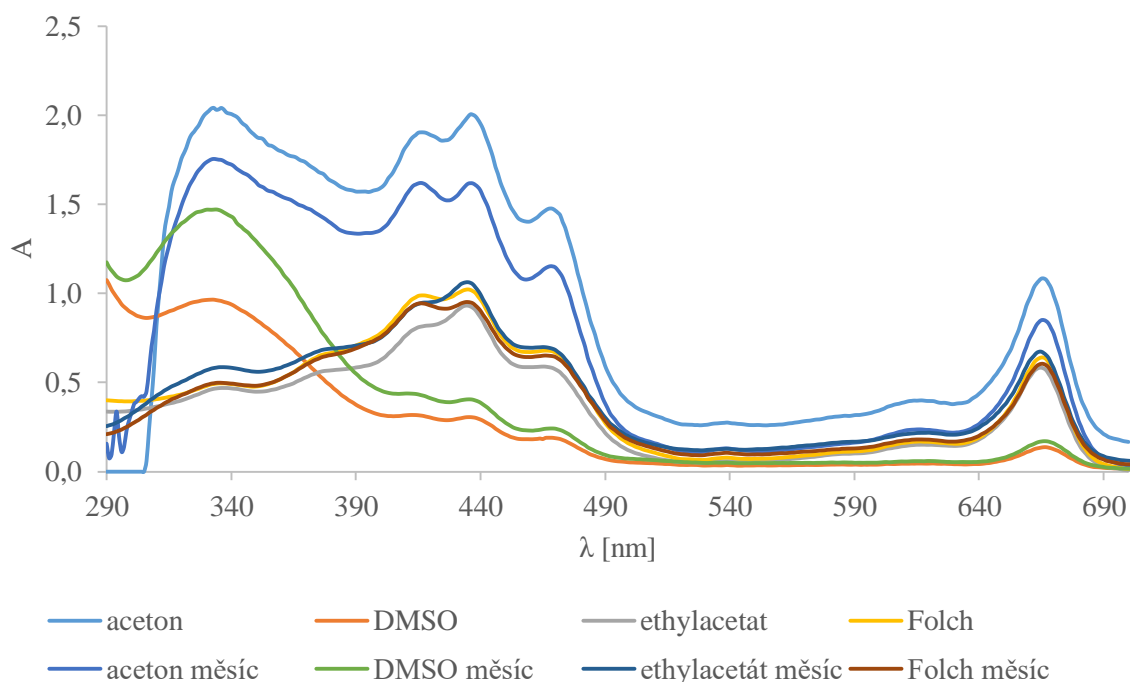
Obr. 10: Absorpční UV–VIS spektra extraktů z papriky - porovnání pro extrakty čerstvé a po měsíci uchovávání

Tab. 8: Obsah karotenoidů v extraktech z papriky po měsíci uchovávání

Extrakční činidlo	A	c [mg·ml ⁻¹]
aceton	0,582	1,57 ± 0,022
DMSO	0,201	0,76 ± 0,013
ethylacetát	0,655	1,72 ± 0,014
Folch	1,665	3,86 ± 0,020

Při porovnání extraktů po době jednoho měsíce můžeme vidět, že vzorky extrahované pomocí acetonu a ethylacetátu se téměř nezměnily. U extrakce pomocí DMSO můžeme vidět mírný pokles v absorbanci. Naopak u extraktu pomocí extrakce dle Folche pozorujeme určitý nárůst absorbance. Jedním z možných důvodů je skutečnost, že v průběhu dlouhodobého uchovávání mohlo dojít ke změnám struktury, případně k částečné degradaci karotenoidů a k přechodu některých derivátů do chloroformové fáze. Nelze vyloučit ani náhodnou chybu měření.

Pro vzorky extraktů ze špenátu byla také naměřena absorpční spektra po 1 měsíci uchovávání a porovnána s naměřenými daty pro čerstvý vzorek viz Obr. 11 a vypočítány koncentrace karotenoidů, hodnoty jsou zobrazeny v Tab. 9.



Obr. 11: Absorpční UV-VIS spektra pro extrakty ze špenátu - porovnání pro extrakty čerstvé a po měsíci uchovávání

Při porovnání dat extrakce ze špenátu vidíme, že i po měsíci je nejvíce karotenoidů obsaženo v acetonu. Jejich obsah však klesl o více než 0,5 mg·ml⁻¹. Obsahy karotenoidů v extrakci dle Folche po měsíci skladování jsou téměř shodné, pokles jen o 0,08 mg·ml⁻¹, s obsahem karotenoidů stanovených přímo po extrakci.

Tab. 9: Obsah karotenoidů v extraktech ze špenátu po měsíci

Extrakční činidlo	A	c [mg·ml ⁻¹]
aceton	1,216	2,91 ± 0,01
DMSO	0,275	0,92 ± 0,02
ethylacetát	0,754	1,93 ± 0,03
Folch	0,697	1,81 ± 0,02

Výsledky stanovení koncentrace karotenoidů po měsíci skladování podpořily výběr extrakce dle Folche, jako vhodný postup extrakce karotenoidů i pro dlouhodobou stabilitu.

5.1.4 Analýza složení extraktů

Pro získání většího množství extraktů z vybraných druhů zeleniny a mikroorganismů byla po předchozí optimalizaci vybrána extrakce dle Folche. Postup extrakce je popsán výše v kapitole 4.5.1.

5.1.4.1 Analýza složení extraktů pomocí HPLC

Extrakt byly dále analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s UV–VIS detektorem. Postup měření je popsán v kapitole 4.6.1. Tab. 10 a Tab. 11 zobrazují složení jednotlivých extraktů analyzované bezprostředně po přípravě a po době jednoho měsíce uchovávání.

Nejvíce karotenoidů obsahoval vzorek mrkve. Ty tvořili více než 90 hm% extraktu. Z tohoto množství tvořil β -karoten přibližně 50 %. Tato data se shodují s hodnotami uváděnými v Tab. 2. U vzorků rajčete a papriky zastoupení karotenoidů dosahovalo 40–50 % celkové hmotnosti extraktu. Špenát a *Chlorella* obsahovaly okolo 15 % a extrakt z kvasinky *Rhodotorula* jen 2 %. Dále vzorky obsahovaly průměrně 3,14 hm% α -tokoferol acetátu a dále okolo 0,5 % koenzymu Q10. Výjimku tvořil jen vzorek mrkve a špenátu, které obsahovaly 4,12 hm% a 1,59 hm% koenzymu Q10.

Tab. 10: Obsah sledovaných aktivních látek v extraktech

vzorky	celkové karotenoidy [hm %]	β -karoten [hm %]	α -tokoferol acetát [hm %]	koenzym Q10 [hm %]
rajče	43,34	27,89	1,71	0,54
mrkev	91,09	50,73	4,66	4,12
paprika	52,64	3,72	1,26	0,49
špenát	16,63	4,42	3,34	1,59
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2,07	–	0,79	0,27
<i>Chlorella vulgaris</i>	14,18	–	7,08	0,34

Vzorky extraktů z rajčete, mrkve, papriky a špenátu byly analyzovány po měsíci uchovávání. Celkové obsahy karotenoidů se při analýzy po měsíci výrazně nelišily, avšak složení jednotlivých karotenoidů bylo odlišné. Retenční čas pro β -karoten byl 8,71 min. Při analýze po měsíci však eluce veškerých složek absorbujících při 450 nm končila v čase 6,5 min, což svědčí o probíhající oxidaci přítomných pigmentů a posunu retenčních časů k nižším hodnotám odpovídajícím výše oxidovaným derivátům. Dále také vzorky

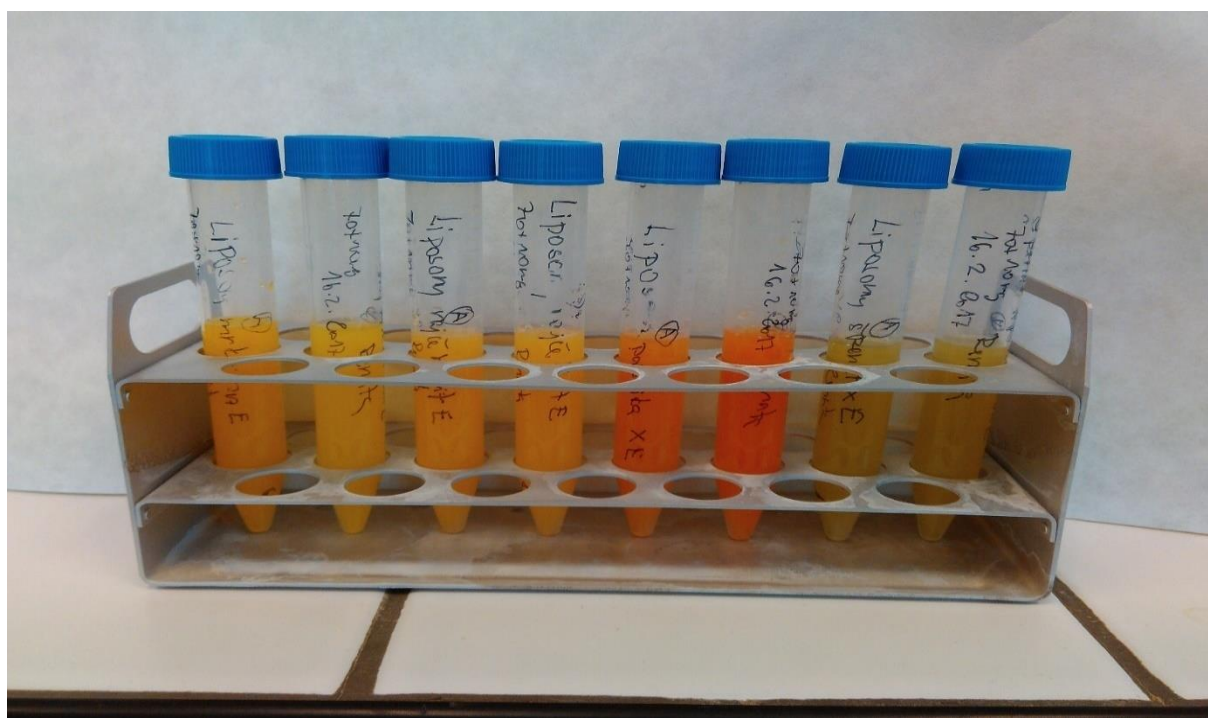
neobsahovaly α -tokoferol acetát. Poslední sledovanou složkou byl koenzym Q10, jenž byl stále přítomen ve všech vzorcích.

Tab. 11: Obsah aktivních látek v extraktech po době jednoho měsíce skladování

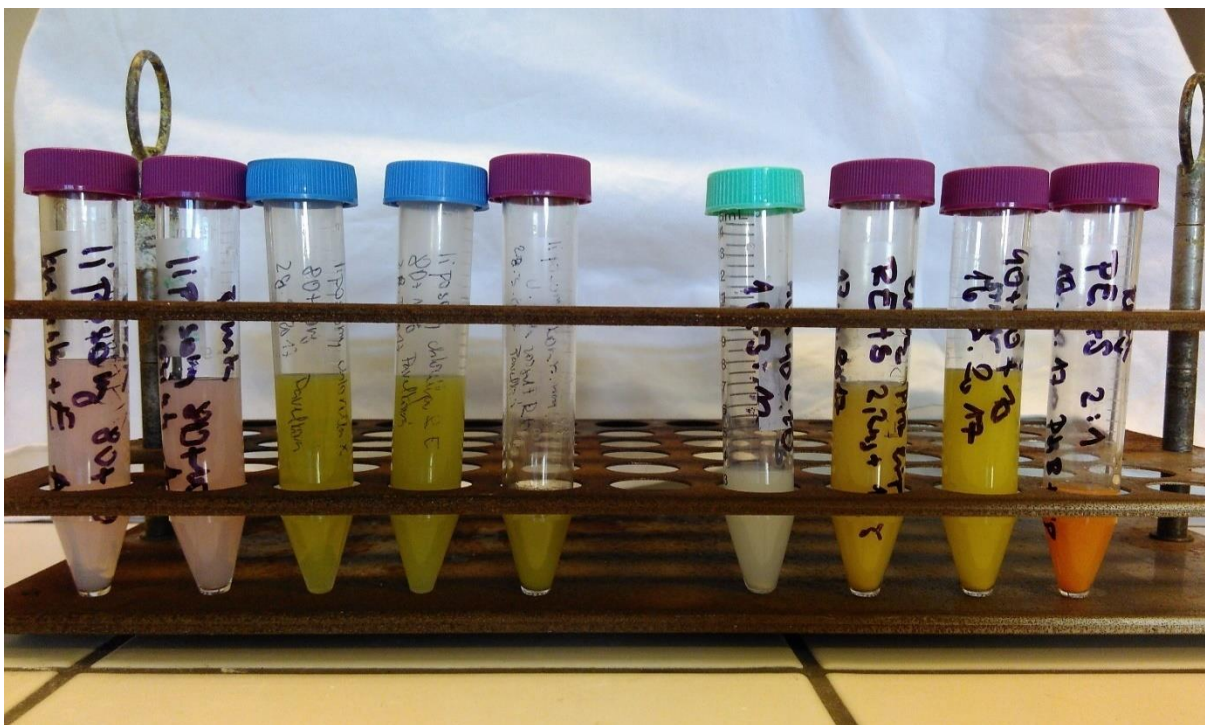
vzorky	celkové karotenoidy [hm%]	β -karoten [hm%]	α -tokoferol acetát [hm%]	koenzym Q10 [hm%]
rajče	47,42	–	–	0,16
mrkev	72,16	–	–	0,21
paprika	51,66	–	–	0,77
špenát	22,42	–	–	0,62

5.2 Liposomové částice

Liposomové částice byly připraveny dle postupu popsáno v kapitole 4.7. Kromě prázdných částic byly také připraveny částice s přidavkem lipidových extraktů ze zeleniny, kvasinky a mikrořasy a dále s přidavkem PHB. Jejich roztoky jsou zobrazeny na Obr. 12 a Obr. 13. U jednotlivých vzorků byla charakterizována jejich velikost a stabilita pomocí přístroje ZetaSizer Nano, dále byla stanovena jejich enkapsulační účinnost (EU) a antioxidační aktivita. U vybraných vzorků byl dále stanoven obsah fosfolipidů a míra cytotoxicity vůči lidským keratinocytům.



Obr. 12: Vzorky liposomů s přidavkem extraktů. Zleva vždy první z dvojice je bez vitamínu E a druhý s vitamínem E, dvojice vzorků jsou uvedeny v pořadí dle enkapsulované složky: rajče, mrkev, paprika a špenát.



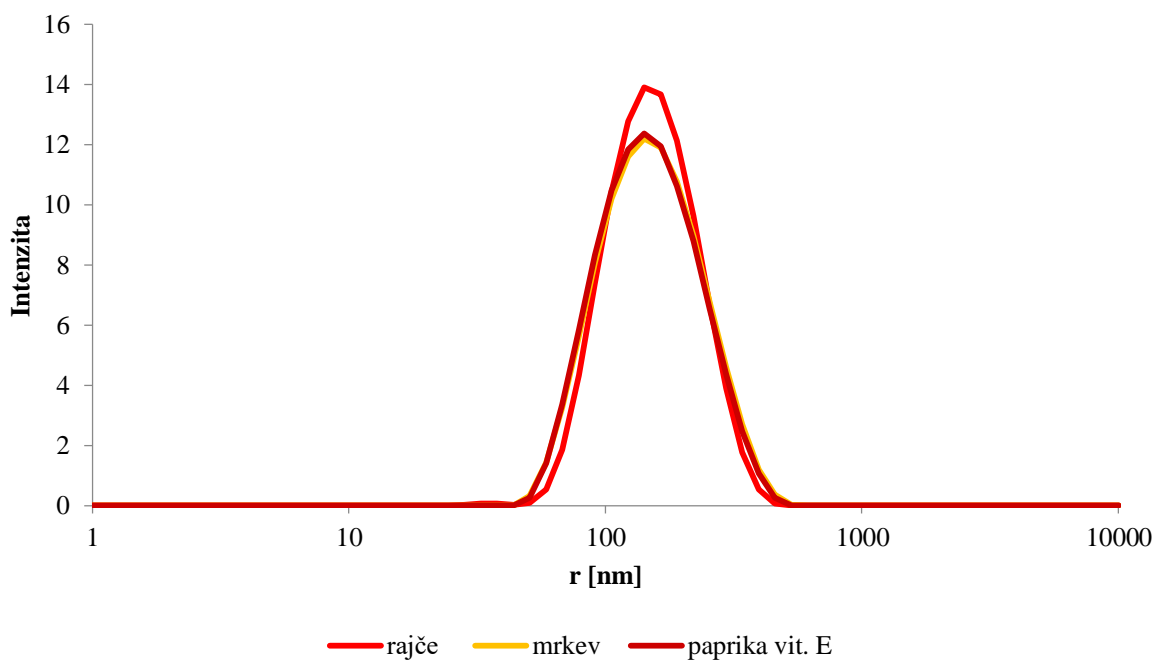
Obr. 13: Vzorky liposomů. Zleva extrakt z *Rhodotorula glutinis* bez a s vitamínem E, extrakt z *Chlorella vulgaris* bez a s vitamínem E; dále liposomy s kombinací extraktu z *Rhodotorula* a *Chlorella*, a s oběma extrakty s vitamínem E. Liposomy s přidavkem PHB: nejprve prázdné, poté s extraktem z rajčete a špenátu, mrkve a špenátu a papriky a špenátu

5.2.1 Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta-potenciálu

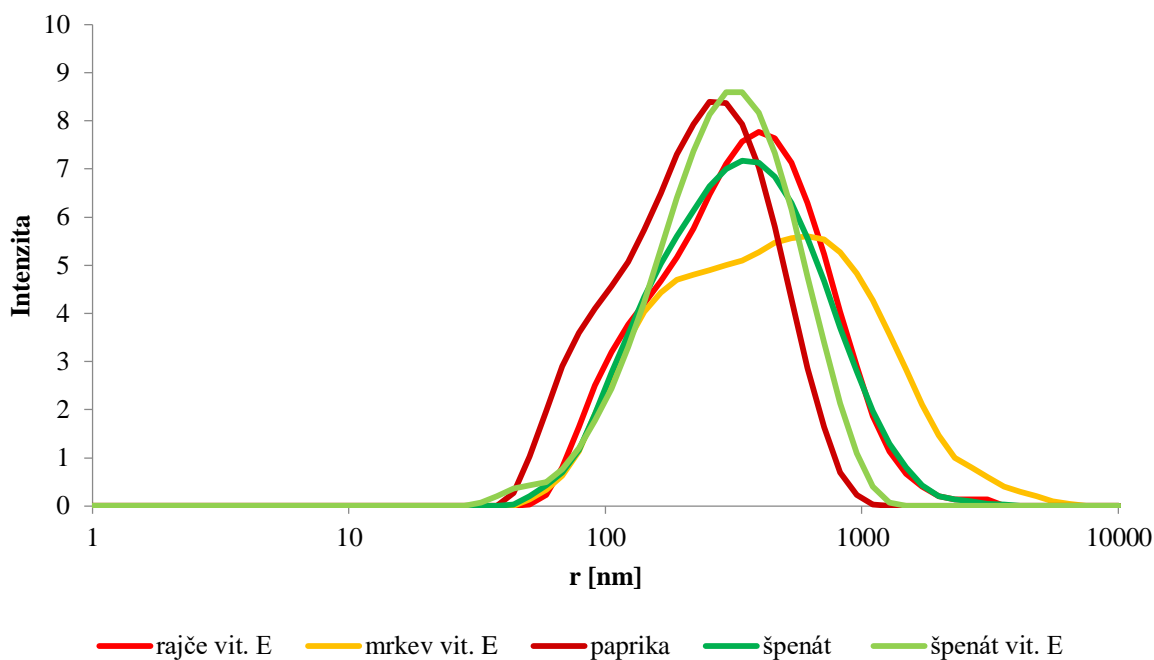
U veškerých vzorků částic byla porovnávána jejich průměrná velikost, polydisperzní index (PdI) a hodnota zeta-potenciálu, které jsou zobrazeny v Tab. 12.

Pro porovnání byly naměřené hodnoty také vyneseny podle podobnosti do grafů vyobrazených na Obr. 14 a Obr. 15. Průměrná velikost připravených liposomů se pohybovala okolo 150–300 nm. Polydisperzní index se u všech vzorků pohyboval do hodnoty 0,5, což nám udává, že vzorky byly relativně málo polydisperzní a byly proto vhodné pro měření velikosti touto metodou. Navíc většina liposomů měla hodnoty PdI v rozmezí 0,1–0,2, což nám o těchto vzorcích říká, že byly relativně monodisperzní.

Připravené liposomové roztoky obsahovaly první den po přípravě 4,1–19,2 % liposomů o velikosti do 100 nm, data viz Tab. 13. Hodnoty odpovídají přesněji liposomům do 91 nm, jelikož další naměřená hodnota byla až pro 105 nm. Daný interval hodnot je vyšší než 1 %, a proto můžeme dané roztoky považovat za roztoky nanočástic [39].



Obr. 14: Zastoupení velikosti liposomů první den po jejich přípravě



Obr. 15: Zastoupení velikostí liposomů první den po přípravě

Dále byl měřen zeta-potenciál připravených částic. Veškeré vzorky měly absolutní hodnotu zeta-potenciálu nad hodnotou $|30|$, což odpovídá stabilním vzorkům.

Kromě klasických liposomů byly připraveny také liposomy obohacené o PHB. Jejich vlastnosti při měření první den po přípravě a po měsíci jsou také zobrazeny v Tab. 12. Oproti klasickým liposomům mají tyto částice mírně větší průměry. Jejich polydisperzní index ale opět nepřekračuje hodnotu 0,50. Jejich koloidní stabilita vykazuje velmi vysoké hodnoty pohybující se kolem -43 mV.

Hodnoty pro velikosti částic, polydisperzitní index a zeta potenciálu byly proměřeny také po době jednoho týdne a měsíce, aby bylo možno stanovit, zda mají částice stále stejné vlastnosti a zda jsou jejich roztoky koloidně stabilní. Jelikož se velikost a polydisperzitní index částic naměřený po době jednoho týdne nijak výrazně nelišily od hodnot naměřených po měsíci, byly pro stručnost tyto hodnoty vynechány a uvedeny pouze hodnoty pro den 31. Pouze pro porovnání koloidní stability byla vynesena do Obr. 18 veškerá naměřená data. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v Tab. 12.

Tab. 12: Vlastnosti liposomů naměřené v první den po přípravě a po měsíci; *d* – průměr liposomů; *PdI* – polydisperzitní index; *ZP* – zeta-potenciál

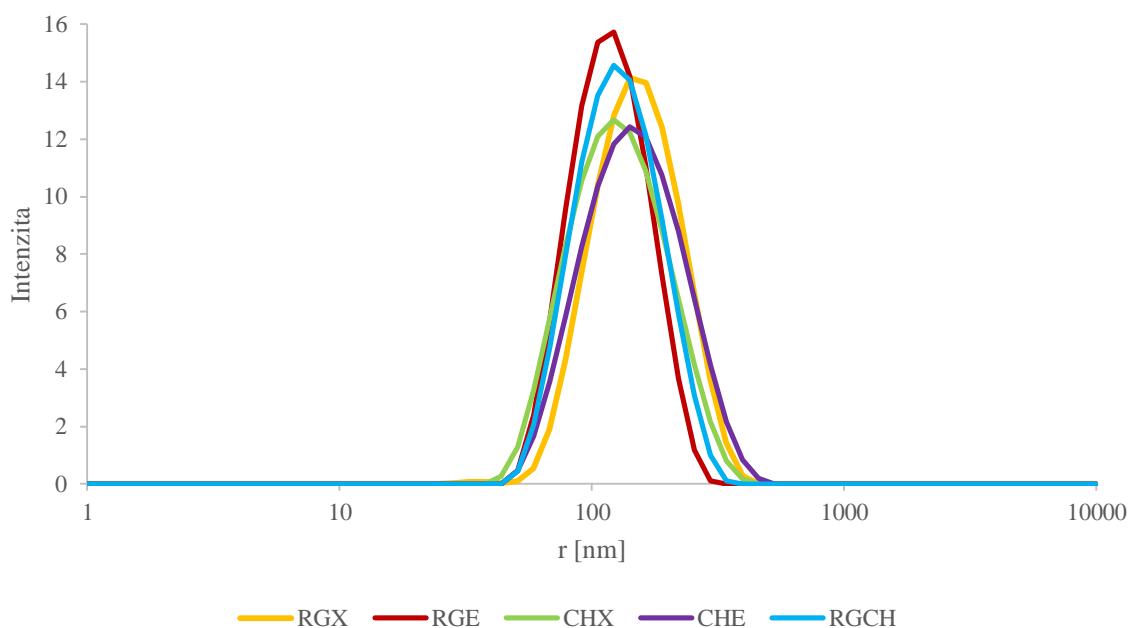
Vzorky liposomů	1. den			31. den		
s vitamínem E	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i>	<i>ZP</i> [mV]	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i>	<i>ZP</i> [mV]
Rajče	273,9 ± 1,7	0,348 ± 0,022	-45,7 ± 1,2	177,6 ± 1,5	0,179 ± 0,010	-35,6 ± 2,3
mrkev	323,1 ± 0,6	0,465 ± 0,006	-44,2 ± 4,4	210,7 ± 4,0	0,254 ± 0,007	-42,2 ± 3,0
paprika	135,5 ± 2,9	0,160 ± 0,004	-42,4 ± 0,9	137,0 ± 1,1	0,162 ± 0,010	-38,6 ± 2,9
špenát	271,8 ± 6,0	0,373 ± 0,036	-45,5 ± 0,7	168,7 ± 1,8	0,192 ± 0,010	-42,8 ± 1,0
<i>Rhodotorula</i>	177,5 ± 1,1	0,264 ± 0,005	-45,6 ± 0,5	126,5 ± 0,8	0,110 ± 0,003	-45,0 ± 1,0
<i>Chlorella</i>	157,9 ± 1,1	0,156 ± 0,003	-43,0 ± 1,6	155,1 ± 0,9	0,168 ± 0,013	-47,9 ± 1,4
<i>Rhodotorula</i> a <i>Chlorella</i>	139,6 ± 0,6	0,147 ± 0,013	-45,5 ± 1,0	135,8 ± 0,5	0,123 ± 0,008	-42,5 ± 0,5
PHB rajče a špenát	308,0 ± 6,2	0,221 ± 0,019	-46,7 ± 1,8	321,8 ± 2,0	0,358 ± 0,045	-42,1 ± 0,2
PHB mrkev a špenát	424,5 ± 7,7	0,433 ± 0,008	-45,4 ± 1,5	321,4 ± 2,5	0,269 ± 0,008	-42,7 ± 1,6
PHB paprika a špenát	390,9 ± 1,5	0,405 ± 0,032	-45,3 ± 1,4	283,4 ± 5,4	0,250 ± 0,018	-43,6 ± 1,2
Liposomy bez vit. E	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i>	<i>ZP</i> [mV]	<i>d</i> [nm]	<i>PdI</i>	<i>ZP</i> [mV]
Rajče	140,1 ± 1,29	0,134 ± 0,037	-38,4 ± 1,5	149,34 ± 1,8	0,199 ± 0,006	-41,1 ± 0,1
mrkev	136,5 ± 7,28	0,166 ± 0,014	-39,2 ± 1,1	141,14 ± 2,2	0,160 ± 0,018	-40,4 ± 0,8
paprika	188,8 ± 2,12	0,362 ± 0,008	-44,0 ± 1,2	143,04 ± 0,3	0,236 ± 0,006	-44,6 ± 0,1
špenát	295,1 ± 3,23	0,399 ± 0,006	-40,8 ± 2,3	298,84 ± 3,6	0,377 ± 0,009	-42,2 ± 0,8
<i>Rhodotorulla</i>	241,7 ± 3,8	0,266 ± 0,002	-46,6 ± 2,3	159,1 ± 0,8	0,136 ± 0,009	-33,1 ± 0,9
<i>Chlorella</i>	136,7 ± 1,3	0,160 ± 0,017	-41,3 ± 1,1	134,1 ± 0,4	0,162 ± 0,006	-48,4 ± 1,4
PHB	285,0 ± 1,5	0,242 ± 0,009	-40,7 ± 1,1	279,2 ± 1,4	0,264 ± 0,003	-39,7 ± 0,7

Tab. 13: Procentuální zastoupení liposomů do průměru 100 nm

procentuální zastoupení liposomů do 100 nm	bez vitamínu E	s vitamínem E
rajče	14,4 ± 2,5	5,2 ± 1,2
mrkev	18,7 ± 0,9	4,1 ± 1,0
paprika	13,9 ± 0,9	19,2 ± 1,4
špenát	4,4 ± 1,1	5,3 ± 1,3

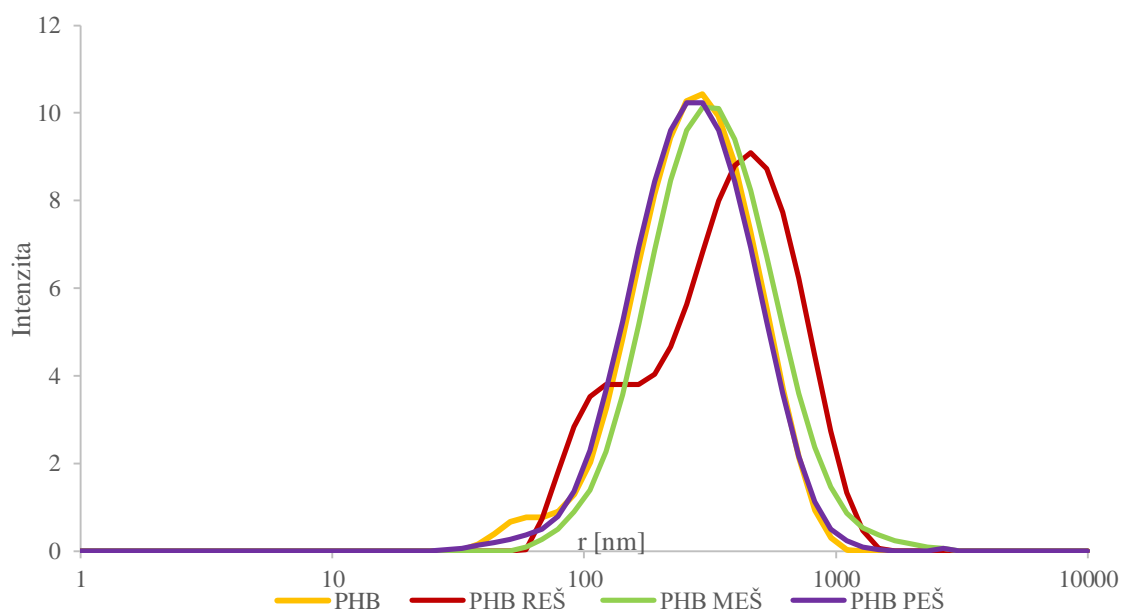
Z dat uvedených výše vyplývá, že při porovnání s daty z prvního dne se tyto hodnoty nijak výrazně nezměnily. Jak průměr částic, polydisperzitní index, tak jejich zeta-potenciál nevykazují žádné výrazné změny. Částice jsou tedy z hlediska těchto porovnávaných parametrů stabilní. Pro přehlednost byla data pro distribuci velikosti liposomů s přídatkem

extraktů vyobrazena na Obr. 16, data pro distribuci velikosti liposomů s přidavkem PHB pak na Obr. 17.



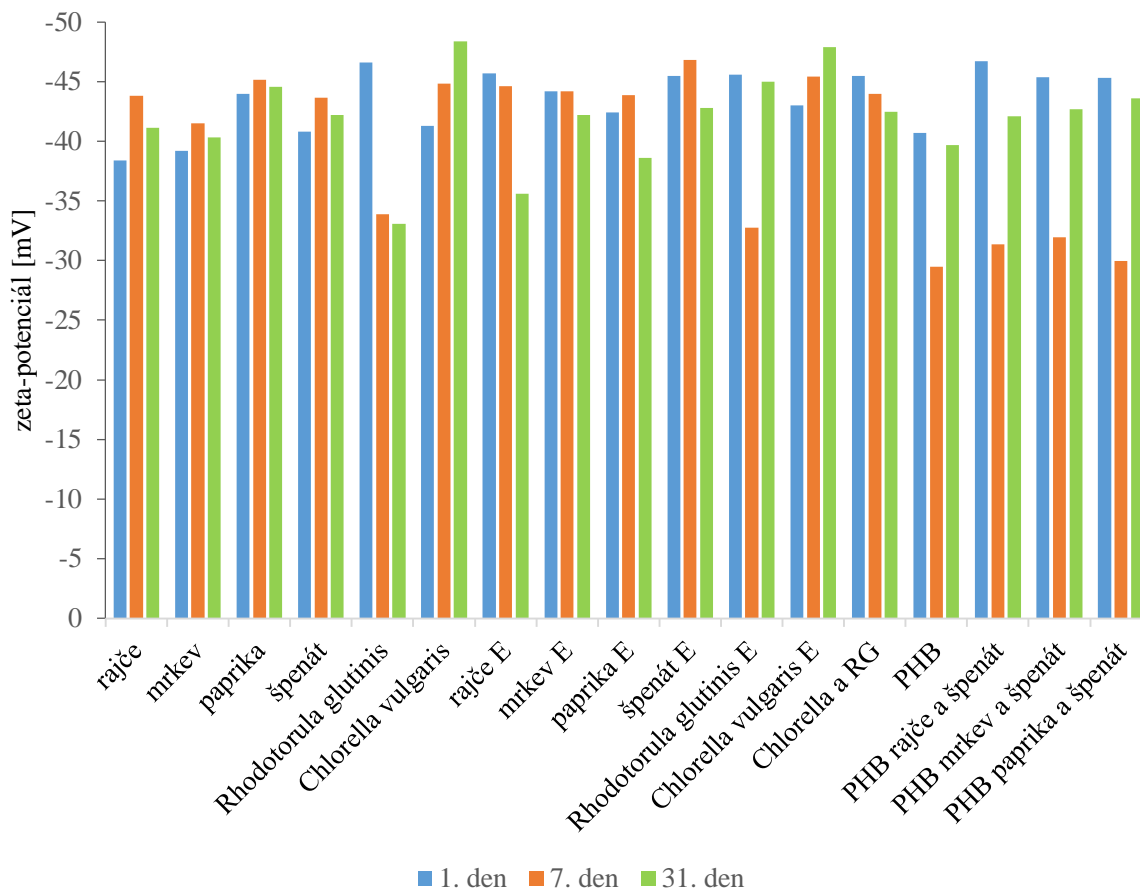
Obr. 16: Zastoupení velikosti liposomů – změny po 1 měsíci uchovávání

Z výše uvedeného grafu vidíme, že dané roztoky liposomů jsou monodisperzní a z dat uvedených v Tab. 12 můžeme říci, že u většiny roztoků liposomů se jejich průměrná velikost pohybuje okolo 150 nm. I polydisperzní index dosahuje hodnot okolo 0,20, což opět potvrzuje, že tyto částice jsou spíše monodisperzní.



Obr. 17: Zastoupení velikosti liposomů s přidavkem PHB po 1 měsíci uchovávání

Částice s přídatkem PHB jsou již více polydisperzní, především vzorek s přídatkem extraktu z rajčete a špenátu s vitamínem E. Toto skutečnost ukazují i vyšší hodnoty polydisperzního indexu. Hodnota PDI však stále nepřesáhla hodnotu 0,50, proto se jedná stále o relativně stabilní vzorky vhodné pro další práci.



Obr. 18: Porovnání koloidní stability u připravených částic první den po přípravě, po týdnu a 1 měsíci uchovávání

Při porovnání stabilit (viz Obr. 18) je ukázáno, že veškeré roztoky částic byly stabilní ihned po přípravě, tak i po týdenním a měsíčním skladování. Objevují se zde mírné odchylky, avšak žádná hodnota zeta-potenciálu v absolutní hodnotě neklesla pod hodnotu 30 mV.

Celkově tedy můžeme shrnout, že veškeré vzorky připravených roztoků částic jsou stabilní i po měsíci skladování a vhodné i pro další práci.

Tab. 14: Porovnání velikosti, PDI a koloidní stability u vzorku liposomů a liposomů s PHB vystavených teplotě 80 °C po dobu 1,5 hod, d – průměr liposomů; PDI – polydisperzní index; ZP – zeta-potenciál

vzorky částic	d [nm]	PdI	ZP [mV]
liposomy	155,6 ± 0,9	0,177 ± 0,027	-33,9 ± 0,4
liposomy při 80 °C	177,9 ± 1,1	0,232 ± 0,011	-43,0 ± 0,8
PHB	268,2 ± 0,5	0,270 ± 0,007	-29,5 ± 0,3
PHB při 80 °C	377,2 ± 5,0	0,304 ± 0,056	-38,5 ± 1,5

Kromě jiného byly také částice testovány, zda zůstanou stabilní i po vystavení teplotě 80 °C, jelikož při formulaci emulzí jsou vodná i olejová fáze temperovány na tuto teplotu. Z dat vyobrazených v Tab. 14 můžeme usoudit, že částice po vystavení teploty 80 °C mají v případě liposomů jen mírně větší velikost (o 20 nm) a také mírně vyšší polydisperzitní index, avšak jejich koloidní stabilita se zvýšila z hodnoty –33,9 mV na –43,0 mV. Pro vzorky s přidavkem PHB jsou oba trendy, tedy zvýšení velikosti, PdI i zvýšení zeta-potenciálu stejné jako u liposomů. Částice se zvětšily téměř o 100 nm, PdI se také zvýšil výrazněji než v případě klasických liposomů. Stabilita se zvýšila podobně jako u liposomů téměř o 10 mV, tedy z hodnoty –29,5 mV na –38,5 mV.

5.2.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena jako koncentrace karotenoidů v supernatantu po centrifugaci liposomů a v rozpuštěných liposomech. Dále byly vzorky připravené dříve proměřeny opět po době jednoho měsíce uchování, a to v rámci sledování dlouhodobé stability liposomů. Výsledky jsou znázorněny v Obr. 19.



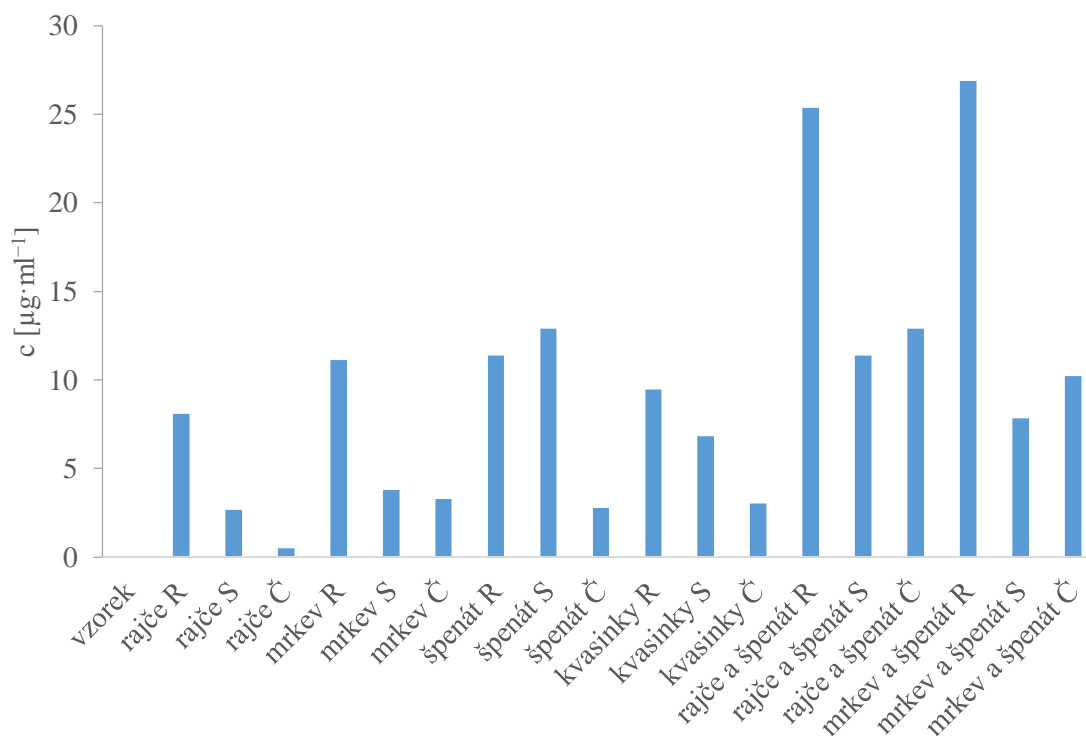
Obr. 19: Porovnání enkapsulační účinnosti pro připravené vzorky liposomů po jejich přípravě a po měsíci skladování. Označení vzorků: R-rajče, M-mrkev, P-paprika, Š-špenát, Ch-Chlorella vulgaris, Rg-Rhodotorula glutinis, x-bez vitamínu E, E-s vitamínem E, RHB – liposomy obohacené o polyhydroxybutyrát, RES – rajče a špenát a s vitamínem E, MES – mrkev a špenát s vitamínem E, PES – paprika a špenát s vitamínem E.

Enkapsulační účinnosti nad 50 % bylo dosaženo u obou vzorků rajčete, špenátu, *Chlorella*, dále vzorků mrkve s vitamínem E, kombinace *Chlorella* a *Rhodotorula*. U všech vzorků s přidavkem PHB byly hodnoty EU velice vysoké. Pro vzorek PHB s přidavkem rajčete a špenátu to bylo 69,2 %, pro PHB s extraktem z mrkve a špenátu 85,7 % a 98,4 % pro vzorek PHB s paprikou a špenátem.

Dále u dříve připravených vzorků proměřena enkapsulační účinnost po době jednoho měsíce uchovávání. U většiny vzorků se hodnoty EU nijak výrazně nelišily. Výjimkou byl vzorek s přidavkem extraktu z mrkve s vitamínem E, kde klesla enkapsulační účinnost o 10 %. Přesto však i po měsíci zůstává jeho EU při porovnání s ostatními extrakty ze zeleniny nejvyšší. Účinné látky, tedy zůstaly enkapsulované v liposomech a neuvolňovaly se do vnějšího prostředí.

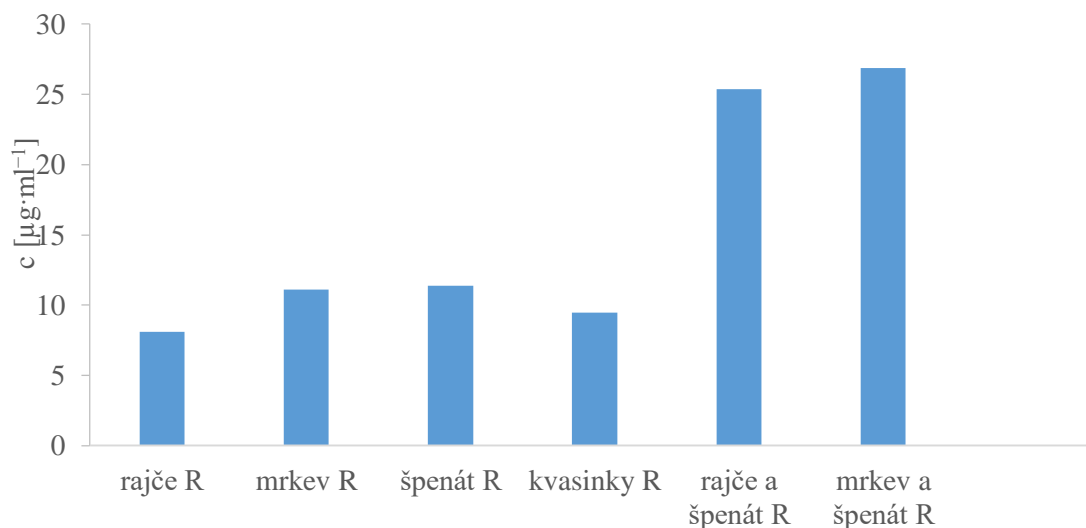
5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno dle postupu popsaneho v kapitole 4.11. Data jsou vynesena na v Obr. 20 a Obr. 21.



Obr. 20: Antioxidační aktivita liposomů. Vzorky označené R-roztoky liposomů bez úpravy, S-supernatant a Č-rozsuspendované částice

Z vypočítaných dat pro veškeré extrakty (viz Obr. 21) platí, že nejvyšší antioxidační aktivitu mají vzorky liposomů bez další úpravy. Při porovnání jednotlivých extraktů je patrné, že vzorky s jedním extraktem jsou si velice podobné. Při použití dvou různých extraktů pozorujeme výrazný nárůst antioxidační aktivity.



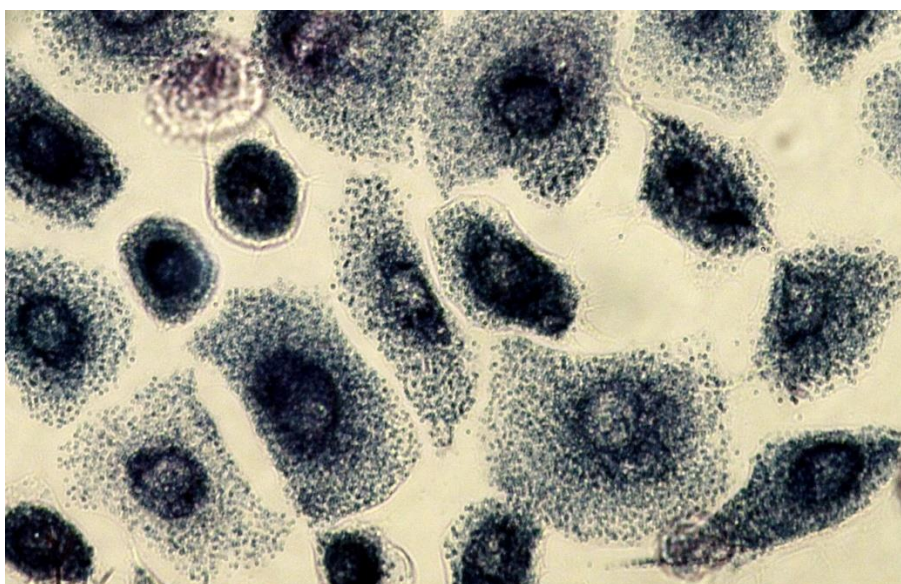
Obr. 21: Antioxidační aktivita roztoků liposomů, R – neupravené roztoky liposomů

5.2.4 Stanovení koncentrace fosfolipidů v liposomech

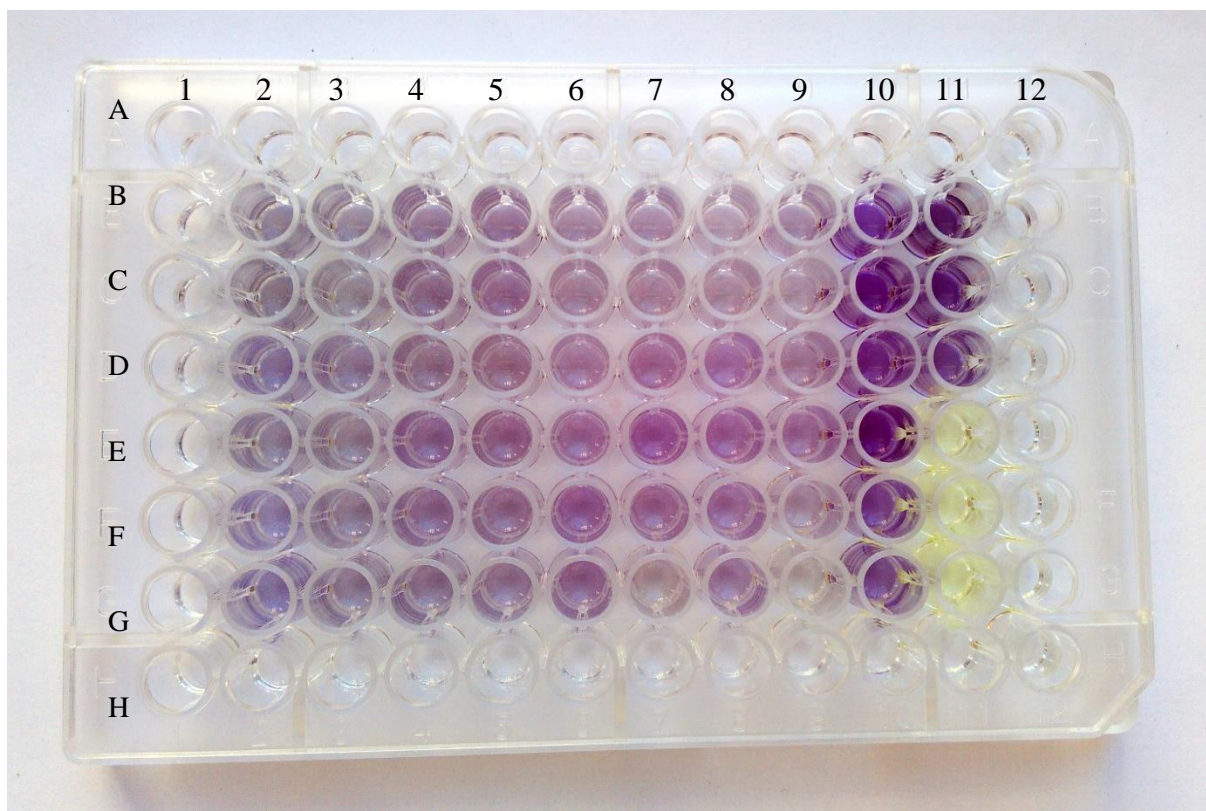
Stanovení koncentrace fosfolipidů u vybraných vzorků liposomů bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 4.12. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 15a Tab. 16v následující kapitole 5.2.5.

5.2.5 Stanovení cytotoxicity

Stanovení cytotoxicity vybraných vzorků liposomů bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 4.13. Na Obr. 22 jsou vyfoceny keratinocyty s MTT a Obr. 23 zobrazuje mikrotitrační destičku s hotovým MTT testem. Tab. 15 a Tab. 16 ukazují přesné složení testovaných liposomů, tedy koncentraci fosfolipidů stanovenou metodou dle Stewarda a obsah aktivní látky a dále, zda daný vzorek ovlivnil metabolismus buněk, což bylo sledováno pomocí MTT testu.



Obr. 22: Keratinocyty s MTT



Obr. 23: Vzorky po vyhodnocení MTT testu,

sloupce: 2 – kontrola, 3–9 – vzrůstající koncentrace liposomů 2–14 %, 10 a 11 B–D kontrola, 11 E–G negativní kontrola (ethanol)

řady: B, C a D – liposomy s extraktem z *Rhodotorula glutinis*, E, F a G - liposomy s extraktem z *Chlorella vulgaris*

U vzorků s extraktem z *Rhodotorula glutinis* první tři nejnižší koncentrace keratinocyty nijak neovlivnily. Dále se zvyšující se koncentrací liposomů docházelo k mírnému poklesu metabolické aktivity buněk. Avšak ani nejvyšší testovaná koncentrace neovlivnila růst buněk natolik, aby mohl být tento vzorek považován za cytotoxický.

Tab. 15: Složení testovaných vzorků liposomů s extraktem z *Rhodotoruly glutinis* a vyhodnocení MTT testu

vzorek	fosfolipidy [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]	extrakt [mg]	aktivita metabolismu [%]
2 %	$0,066 \pm 0,008$	$0,0019 \pm 8,77 \cdot 10^{-6}$	$100,10 \pm 0,97$
4 %	$0,131 \pm 0,016$	$0,0037 \pm 1,75 \cdot 10^{-5}$	$103,70 \pm 4,04$
6 %	$0,197 \pm 0,024$	$0,0056 \pm 2,63 \cdot 10^{-5}$	$104,49 \pm 2,67$
8 %	$0,263 \pm 0,032$	$0,0075 \pm 3,51 \cdot 10^{-5}$	$85,41 \pm 2,64$
10 %	$0,329 \pm 0,040$	$0,0093 \pm 4,83 \cdot 10^{-5}$	$81,99 \pm 0,17$
12 %	$0,394 \pm 0,048$	$0,0112 \pm 5,26 \cdot 10^{-5}$	$69,36 \pm 5,05$
14 %	$0,460 \pm 0,056$	$0,0131 \pm 6,14 \cdot 10^{-5}$	$70,37 \pm 1,52$

Pro vzorky liposomů s extraktem z *Chlorella vulgaris* byly zjištěny velice podobné hodnoty jako pro předchozí vzorek. Opět první tři nejnižší koncentrace buněčný metabolismus nijak neovlivňují. Pro vyšší koncentrace opět pozorujeme podobný trend, kdy

se zvyšující se koncentrací docházelo k mírnému snižování aktivity buněčného metabolismu. Opět však můžeme říci, že žádný ze vzorků není cytotoxický.

Tab. 16: Složení testovaných vzorků liposomů s extraktem z *Chlorelly vulgaris* a vyhodnocení MTT testu

vzorek	fosfolipidy [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]	extrakt [mg]	aktivita metabolismu [%]
2 %	$0,079 \pm 0,007$	$0,0021 \pm 1,49 \cdot 10^{-5}$	$100,38 \pm 4,15$
4 %	$0,159 \pm 0,014$	$0,0041 \pm 2,98 \cdot 10^{-5}$	$104,82 \pm 4,82$
6 %	$0,238 \pm 0,020$	$0,0062 \pm 4,46 \cdot 10^{-5}$	$102,25 \pm 7,07$
8 %	$0,317 \pm 0,027$	$0,0083 \pm 5,95 \cdot 10^{-5}$	$98,07 \pm 5,95$
10 %	$0,397 \pm 0,034$	$0,0104 \pm 7,44 \cdot 10^{-5}$	$90,51 \pm 9,81$
12 %	$0,476 \pm 0,041$	$0,0124 \pm 8,93 \cdot 10^{-5}$	$93,25 \pm 1,61$
14 %	$0,555 \pm 0,047$	$0,0145 \pm 1,04 \cdot 10^{-4}$	$81,67 \pm 5,14$

5.3 Emulze O/V

Jako finální produkt byly navrženy 10 % emulze O/V. Pro jejich přípravu bylo nejprve nutné otestovat řadu látek na míru ochrany proti slunečnímu záření. Poté byly emulze připraveny stanovena jejich míra protekce vůči UVB záření a na závěr otestována jejich stabilita pomocí analytické centrifugy.

5.3.1 Stanovení SPF

Stanovení SPF bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 4.6.2.1. Nejprve byla testována vhodnost samotné metody pomocí komerčních dostupných prostředků na opalování, a dále pak vybrané oleje, aktivní látky, částice, a nakonec i připravené emulze.

5.3.1.1 Komerční produkty na ochranu proti slunečnímu záření

Pro otestování vybrané metody stanovení SPF byly nejprve vybráno několik komerčně dostupných prostředků na opalování. Postup měření je uveden v kapitole 4.6.2.1.

Tab. 17: Porovnání hodnot SPF deklarovaných výrobcem a vypočítaných hodnot

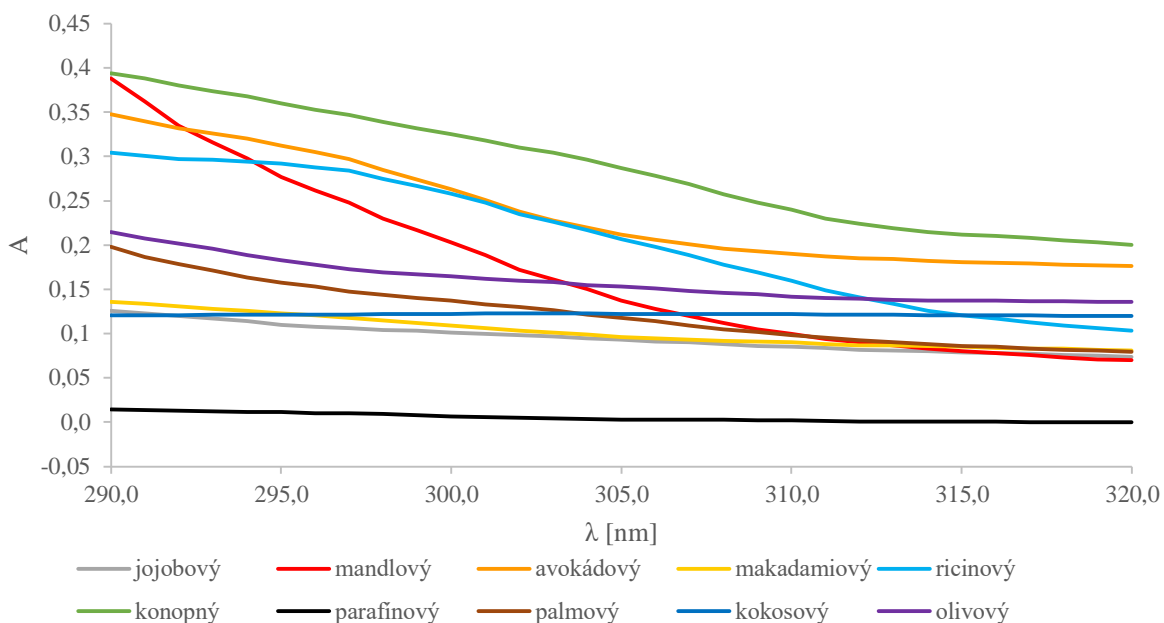
vzorky	SPF deklarované výrobcem	SPF vypočítané
Uriage krém	30+	$35,54 \pm 1,60$
Bioderma Matifying fluid	30	$25,45 \pm 1,16$
Astrid olej	15	$14,23 \pm 0,27$
SunDance olej (DM)	6	$11,52 \pm 0,11$

Tab. 17 zobrazuje testované opalovací prostředky, jejich SPF zobrazený na obalu a dále námi vypočítanou hodnotu SPF. U prvního a třetího vzorku se deklarovaná hodnota nijak výrazně neliší od vypočítané. U druhého vzorku je námi vypočítaná hodnota mírně nižší. Naopak u posledního vzorku je námi vypočítaná hodnota vyšší. To však mohlo být způsobeno faktem, že se firma chrání proti možné degradaci vzorku během používání při teplých letních

podmínkách a do vzorku raději přidává aktivní látky o trochu více. Testovaná metoda byla vyhodnocena jako vhodná pro měření SPF v rozmezí hodnot 6–30.

5.3.1.2 Komerčně dostupné oleje

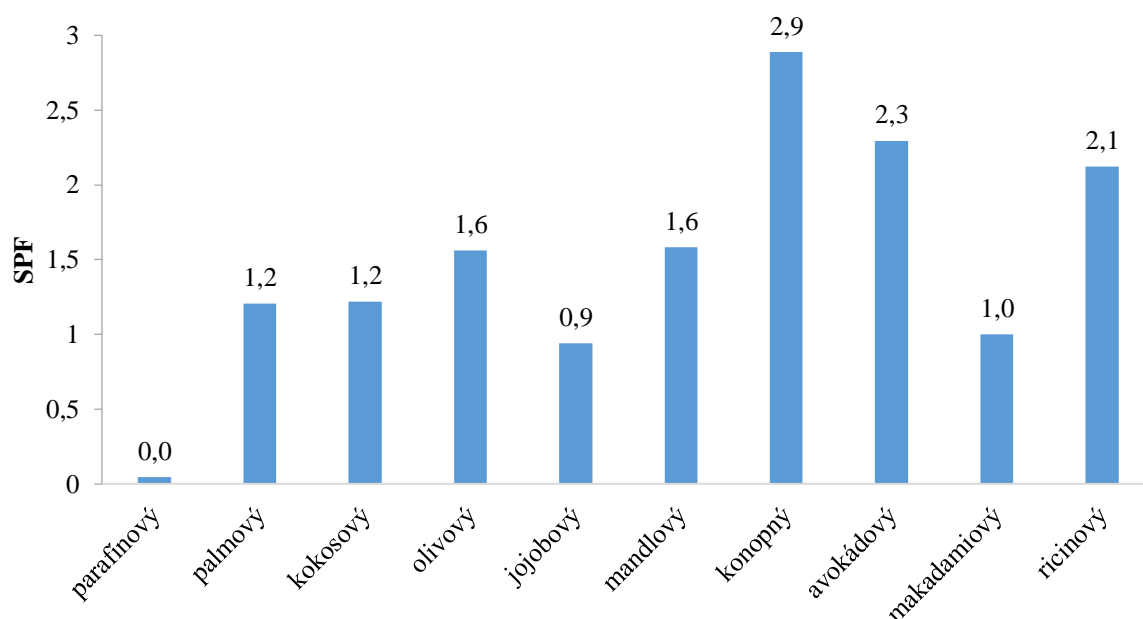
U komerčně dostupných olejů byla porovnávána absorpční spektra a z nich vypočítaná hodnota SPF. Obr. 24 znázorňuje porovnání absorpčních spekter těchto olejů. Parafrinový olej (černě), který je hlavní součástí původního postupu pro přípravu emulze, absorboval ze všech testovaných olejů nejméně UVB záření, proto byla snaha tento olej v emulzi nahradit vhodnějším. Za tímto účelem byla otestována celá řada dalších olejů.



Obr. 24: Porovnání absorpčních spekter pro komerční oleje

Makadamový olej (žlutě), jojobový (šedě) a kokosový (tmavě modře) absorbovaly záření velice podobně a hodnota absorbance se ve sledovaném rozsahu vlnových délek výrazně nelišila. Ještě lépe na tom byly vzorky oleje olivového (fialově) a palmového (hnědě), jejichž absorbance měla v průběhu sledovaných vlnových délek o něco vyšší hodnoty než u předchozích olejů, ale mírně klesající charakter. U mandlového oleje měla absorbance ve sledovaném rozsahu vlnových délek výrazně klesající charakter, a proto nebyl vybrán jako vhodný pro další práci. Oleje ricinový (světle modře) a avokádový (oranžově) vykazovaly absorbanci také s klesajícím charakterem, ale jejich absorbance neklesla pod hodnotu 0,1. Jako nejlepší olej byl díky nejvyšším hodnotám absorbance, a tím i SPF vybrán olej konopný (tmavě zeleně), který byl i dále v této práci využíván.

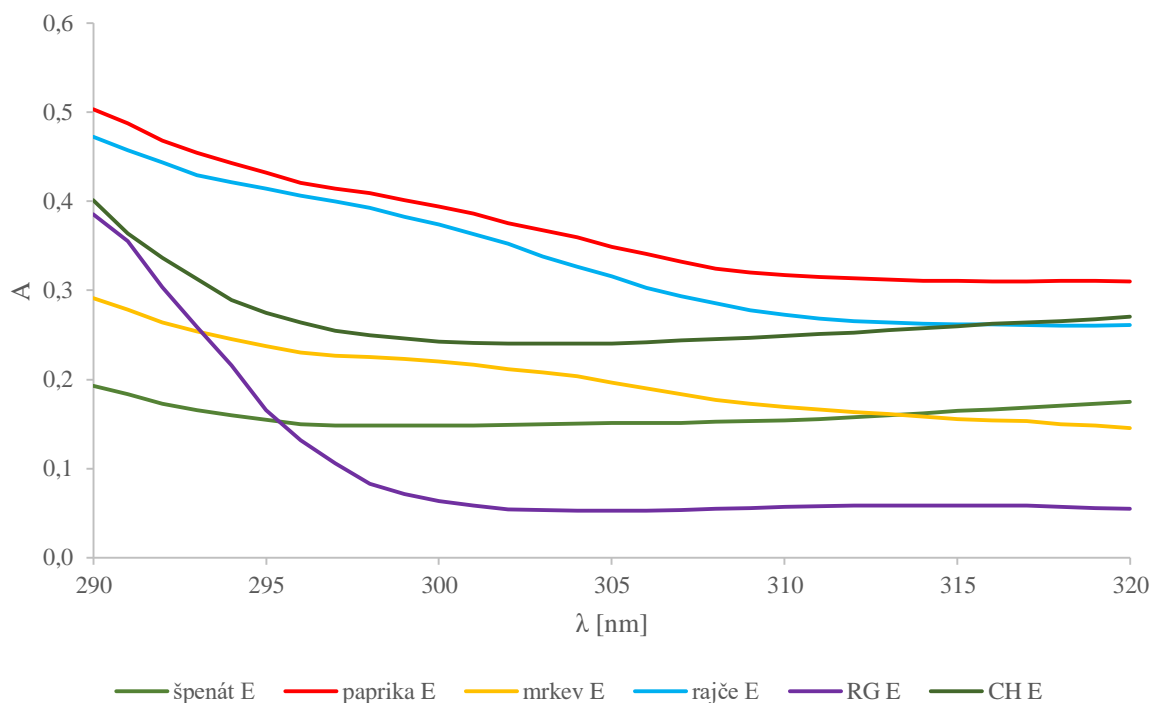
Dále tento výběr potvrzuje i porovnání SPF pro jednotlivé oleje (viz Obr. 25). Z něj vidíme, že nejvyšší SPF má olej konopný s hodnotou SPF 2,9. Dále vykazují srovnatelně vysoké hodnoty i další oleje: avokádový s SPF 2,3 a ricinový SPF 2,1, což jsou hodnoty několikanásobně vyšší než pro parafrinový olej s hodnotou SPF 0,04.



Obr. 25: Porovnání hodnot SPF u olejů

5.3.1.3 Aktivní látky

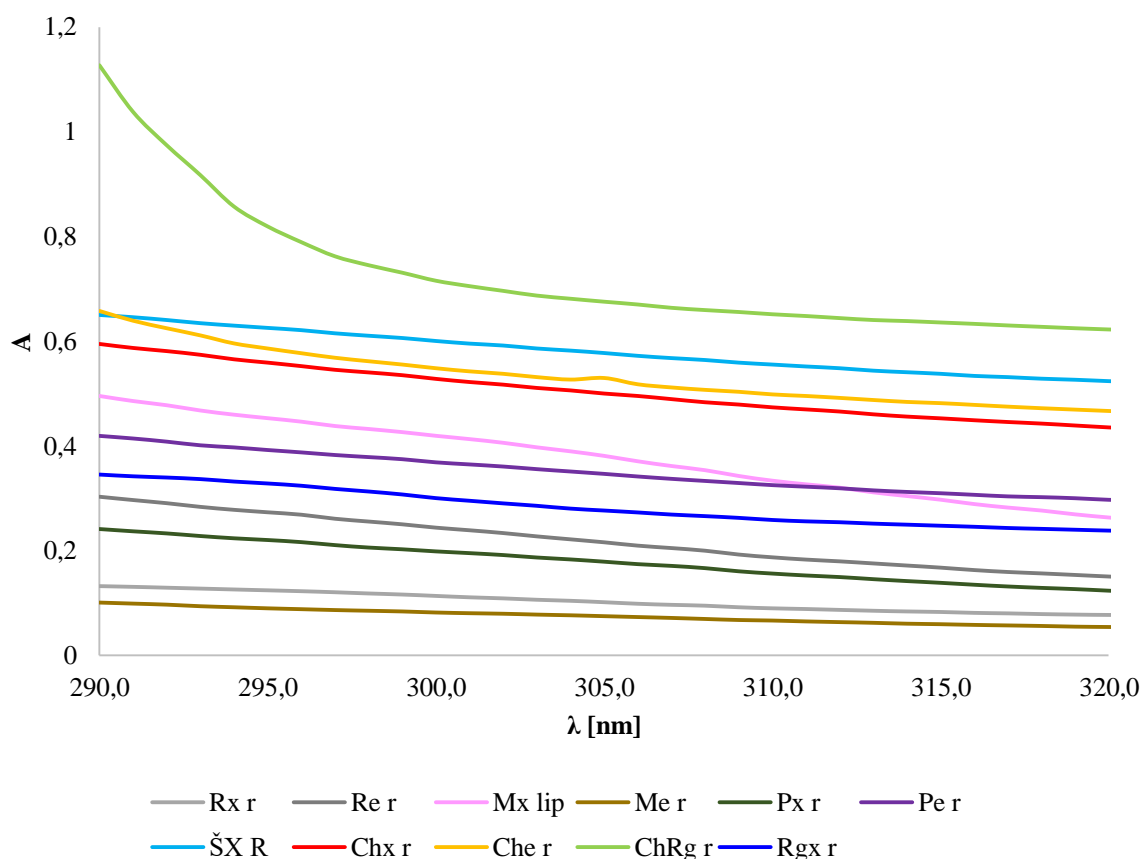
Při porovnání absorpčních spekter extraktů s vitamínem E (viz Obr. 26), vidíme, že jako nejlepší z hlediska UV absorpce se jeví vzorek papriky, rajčete a extraktu mikrořasy *Chlorella vulgaris*. Přesto bylo dále pracováno i s dalšími extrakty a využito aditivního charakteru absorpce záření vzorky.



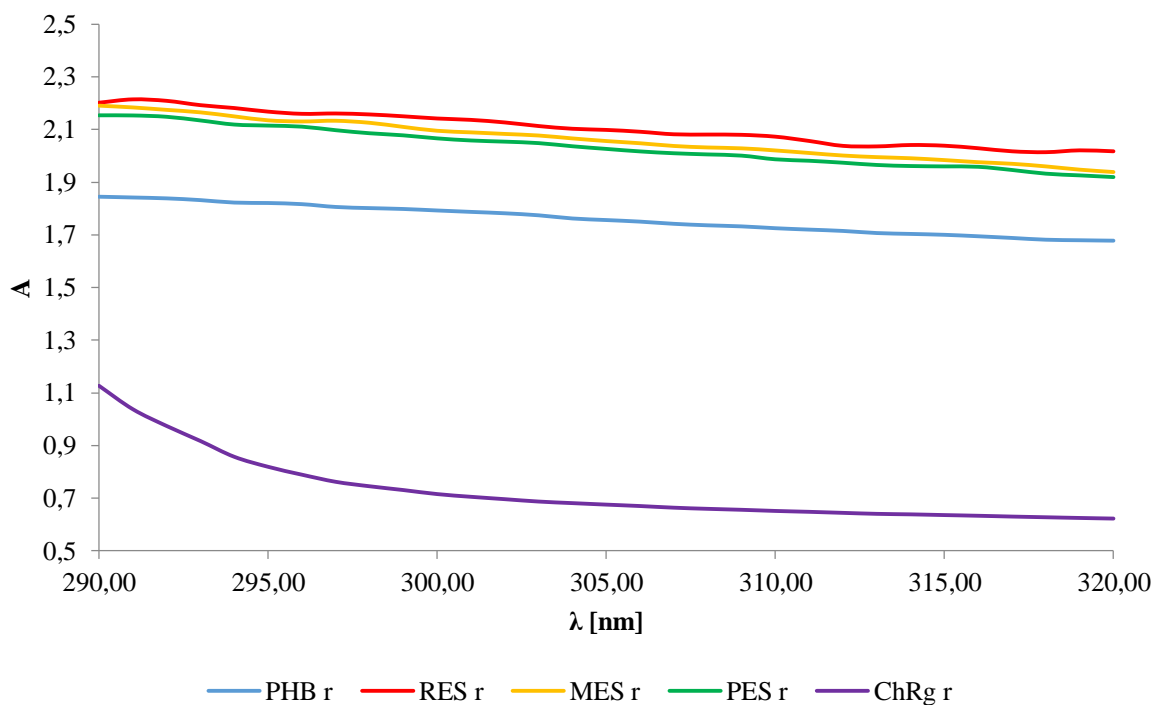
Obr. 26: Porovnání absorpčních spekter extraktů s vitamínem E

5.3.1.4 Liposomy

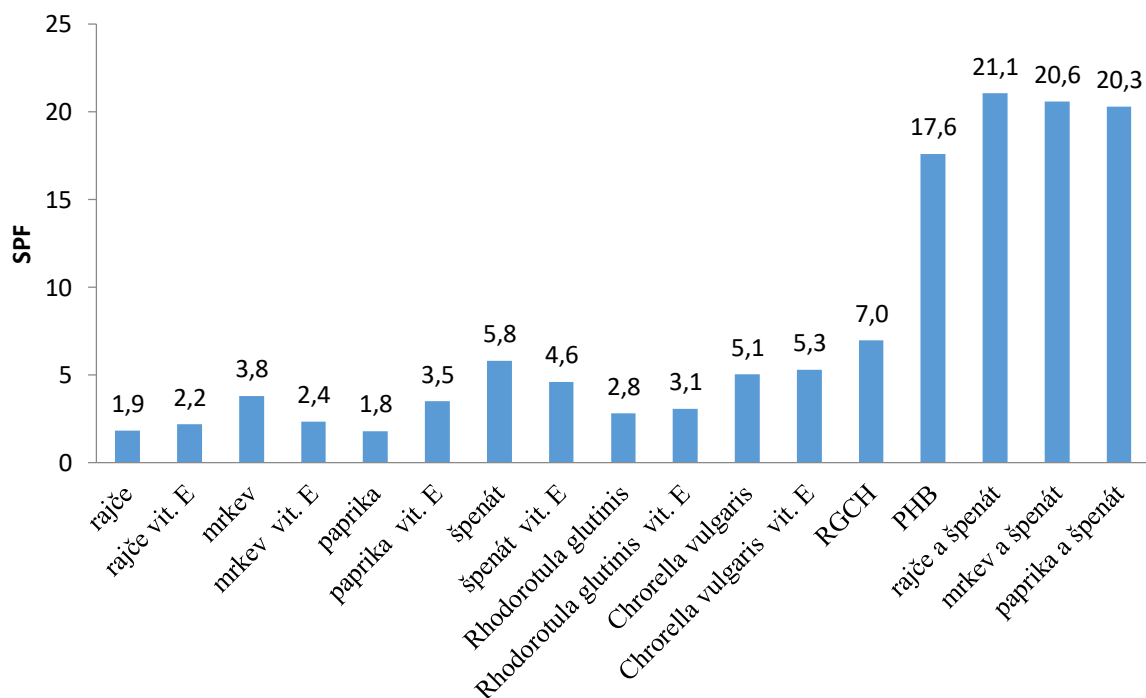
Při porovnání absorpčních spekter roztoků liposomů na Obr. 27 vidíme, že nejvyšších absorpcí záření dosahuje roztok liposomů s extraktem z *Rhodotorula glutinis* v kombinaci s *Chlorella vulgaris*. Poté následují vzorky špenátu bez vitamínu E a chlorely s i bez vitamínu E. Absorbance vzorků s přidavkem PHB je však v porovnání s klasickými liposomy mnohem vyšší (viz Obr. 28). Vliv přidavku extraktů je patrný, však druh extraktů nehraje až tak významnou roli. Na Obr. 29 pak vidíme přímo porovnání hodnot SPF, které potvrzují, že z vzorků liposomů je nejlepší vzorek s kombinací extraktů s *Rhodotorula glutinis* a *Chlorella vulgaris*. Dále pak je patrný výrazný nárůst SPF u vzorků s přidavkem PHB.



Obr. 27: Porovnání absorpčních spekter roztoků liposomů v UVB oblasti extrakty: R – rajče, M – mrkev, P – paprika, Š – špenát, Ch - *Chlorella vulgaris*, Rg – *Rhodotorula glutinis*, ChRg – *Chlorella vulgaris* a *Rhodotorula glutinis*, x – bez vitamínu E, E – s vitamínem E, r – roztoky liposomů



Obr. 28: Porovnání UVB spekter pro roztoky liposomů s PHB a vzorek s kombinací extraktů z mikroorganismů *Rhodotoruly glutinis* a *Chlorelly vulgaris*, PHB r – roztok liposomů s přidavkem PHB bez enkapsulovaného extraktu, RES r – roztok liposomů s PHB a enkapsulovaným extraktem z rajčete a špenátu s vitamínem E, MES r - roztok liposomů s PHB a enkapsulovaným extraktem z mrkve a špenátu s vitamínem E, PES - roztok liposomů s PHB a enkapsulovaným extraktem z papriky a špenátu s vitamínem E, ChRg r – roztok liposomů s extraktem z *Chlorella vulgaris* a *Rhodotorula glutinis*.



Obr. 29: Porovnání SPF roztoků částic

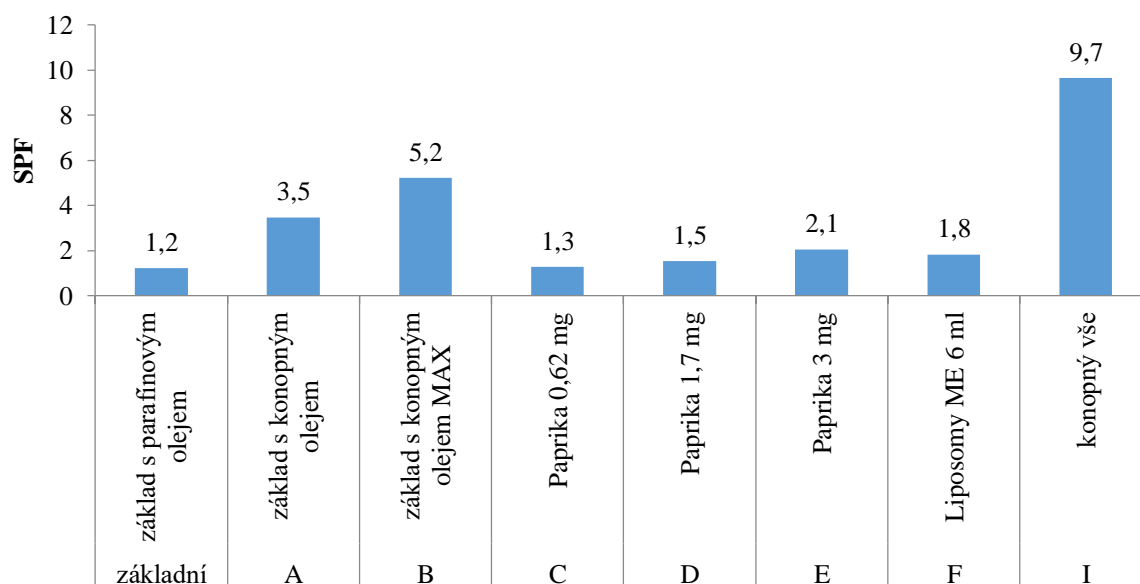
5.3.1.5 Emulze

Emulzní základy byly připraveny dle postupu popsaného v kapitole 4.14. Pro dosažení co nejlepšího SPF byla testována řada modifikací jak vodné, tak olejové fáze emulze. Jelikož v kapitole 5.3.1.2 byl vyhodnocen jako nejlepší olej konopný, byl dále použit ve dvou různých přídavcích pro modifikaci olejové fáze (vzorky A a B viz

Tab. 4 Obr. 30). Z uvedených výsledků vidíme, že větší přídavek konopného oleje přispěl k zvýšení SPF až na hodnotu 5,2.

Dále byly testovány různé přídavky extraktů. Jako modelový extrakt byla vybrána paprika, kdy bylo přidáno 0,62–3,00 mg tohoto extraktu. Na Obr. 30 můžeme opět pozorovat zvýšení SPF s vyšším přídavkem extraktu. Tyto změny však nejsou příliš výrazné. Jako poslední byl testován přídavek liposomů, který také přispěl ke zvýšení SPF.

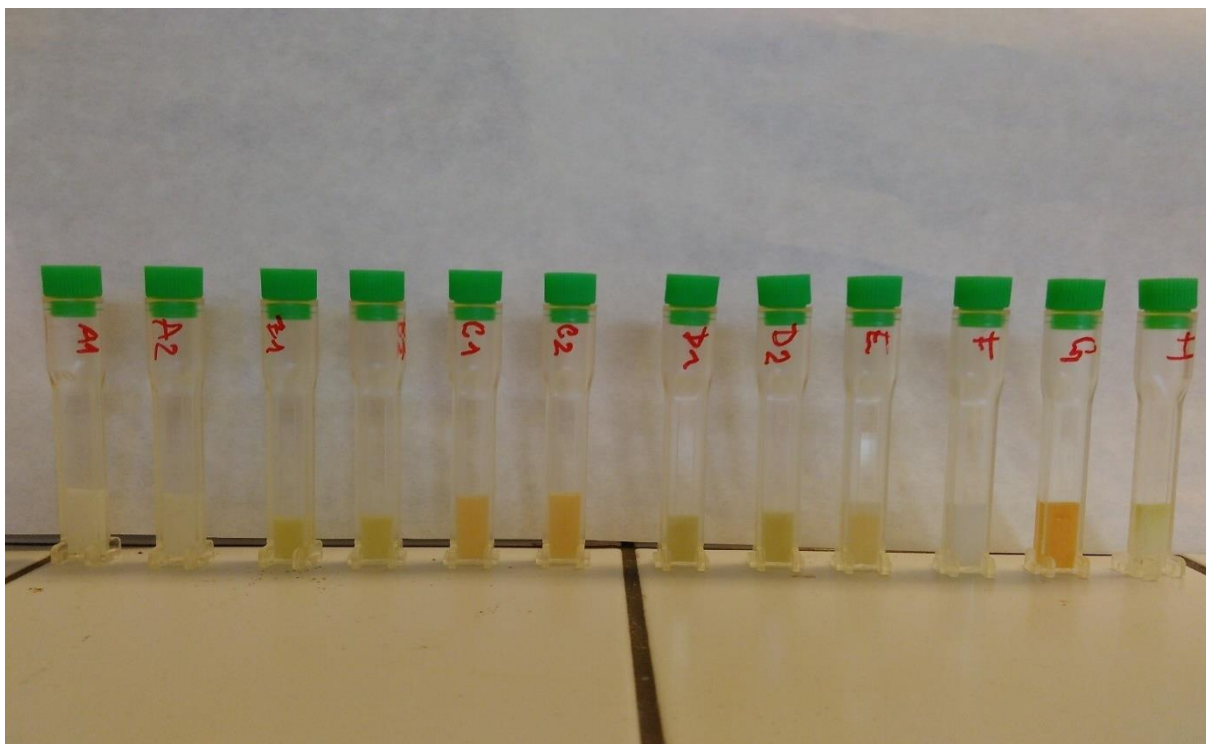
Finálním vzorkem byl tedy vzorek I, který kombinuje všechny výše popsané modifikace jak olejové, tak vodné fáze, kdy bylo takto možné dosáhnout emulze s SPF 9,7.



Obr. 30: Hodnoty SPF připravených emulzí

5.3.2 Stanovení stability emulzí pomocí analytické centrifugace

U vzorků připravených emulzí byla sledována sedimentační stabilita pomocí analytické centrifugace. Výsledkem toho měření byla řada grafů znázorňujících transmisní profil vzorků v různých částech kyvety v čase a také hodnoty indexu nestability. U jednotlivých vzorků byly sledovány různé projevy nestability. Individuální vzorky emulzí po analýze jsou zobrazeny na Obr. 31 a jejich složení popisuje Tab. 18.

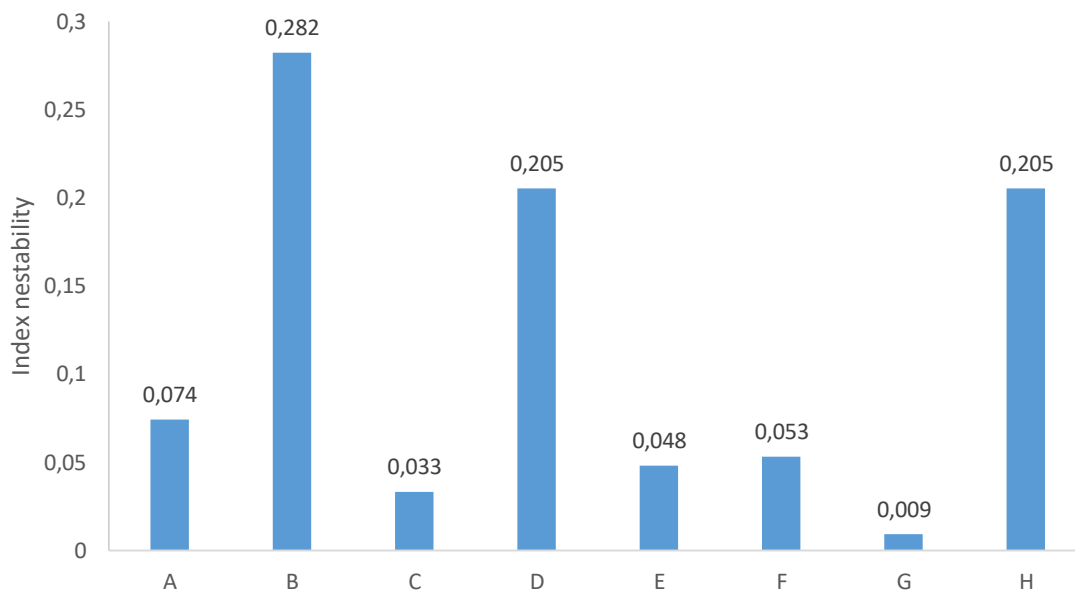


Obr. 31: Emulze po analýze pomocí analytické centrifugy

Tab. 18: Označení emulzí a jejich složení

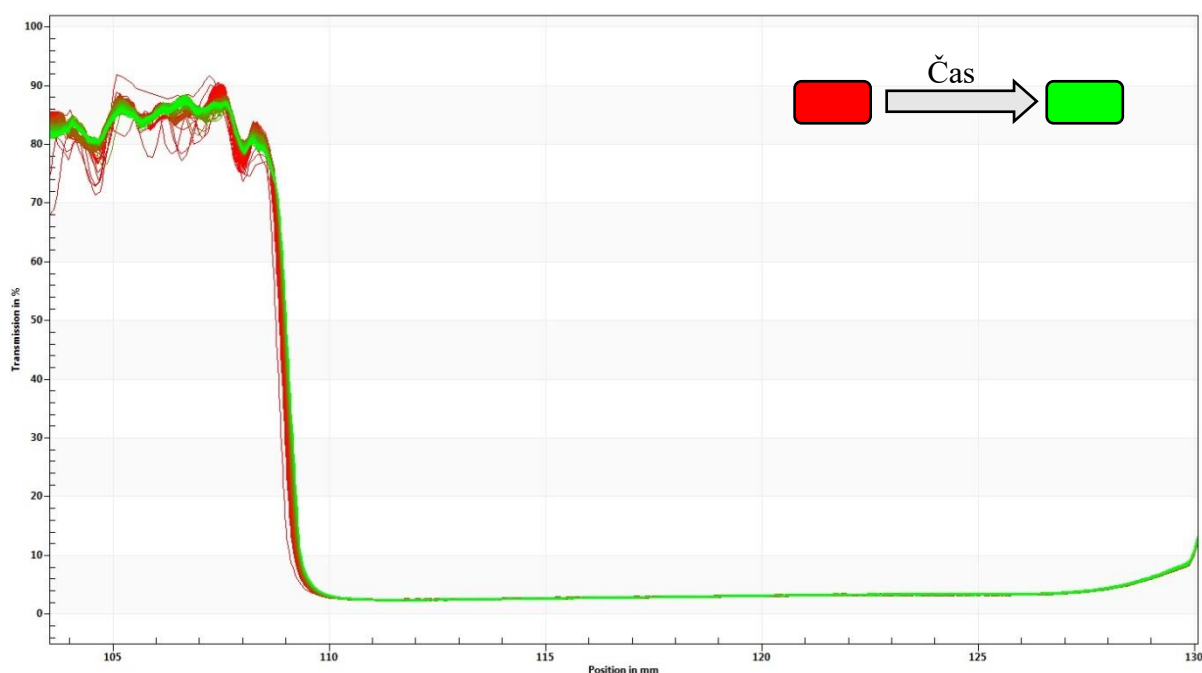
vzorek	označení vzorku v Tab. 4	složení emulze
A	F	liposommy s extraktem z mrkve
B	I	konopný olej, extrakt z RG a ChV, částice, stabilizátor lecithin a ercawax
C	D	extrakt z papriky 1,17 mg
D	H	konopný olej, extrakt z RG a ChV, částice, stabilizátor ercawax
E	C	extrakt z papriky 0,62 mg
F	–	Původní složení emulze
G	E	extrakt z papriky 3,0 mg
H	G	extrakt z RG a ChV, částice

Hlavním sledovaným parametrem byl index nestability, který udává míru nestability vzorku. Čím vyšší hodnotu má index nestability hodnotu, tím méně stabilní vzorek je. Hodnoty indexu nestability pro jednotlivé vzorky jsou zobrazeny na Obr. 32.



Obr. 32: Hodnoty indexu nestability

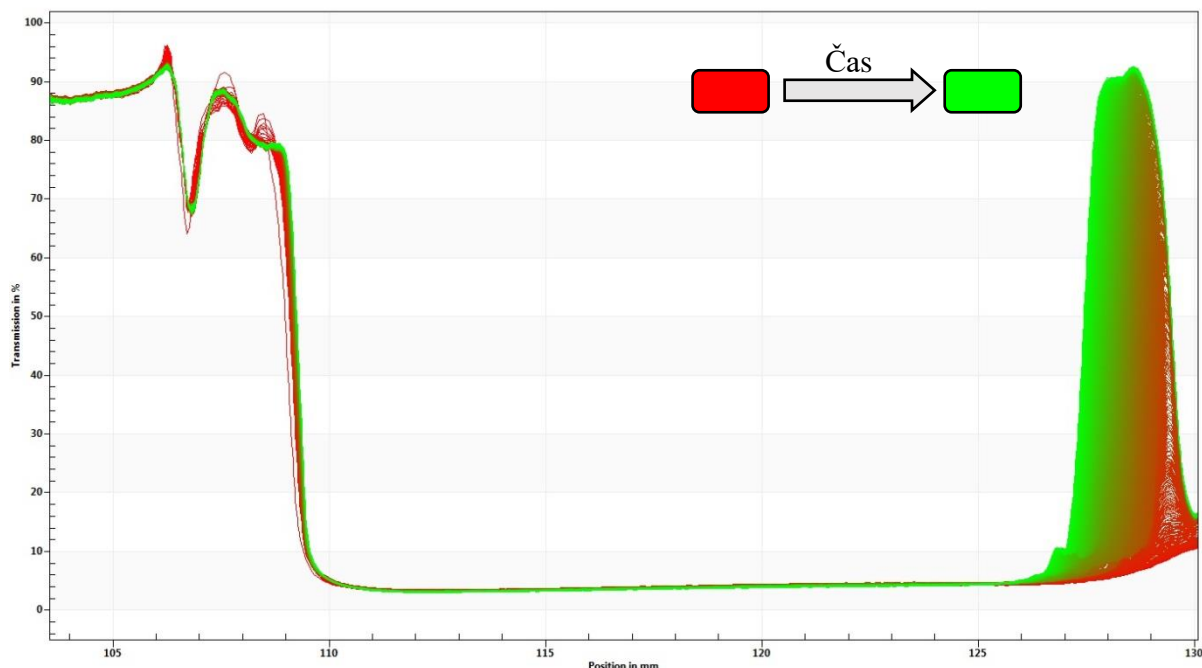
Nejstabilnějším vzorkem byl vzorek G emulze s 3,0 mg extraktu z papriky. U toho vzorku nebyly pozorovány žádné výrazné projevy nestability, jak ukazuje Obr. 33. Jednotlivé nasnímané profily vzorku jsou totožné, což nám říká, že při analýze nedošlo k žádné změně sedimentační stability.



Obr. 33: Graf závislosti transmitance na poloze v kyvetě pro nejstabilnější vzorek (G) emulze s přidavkem extraktu z papriky 3,0 mg

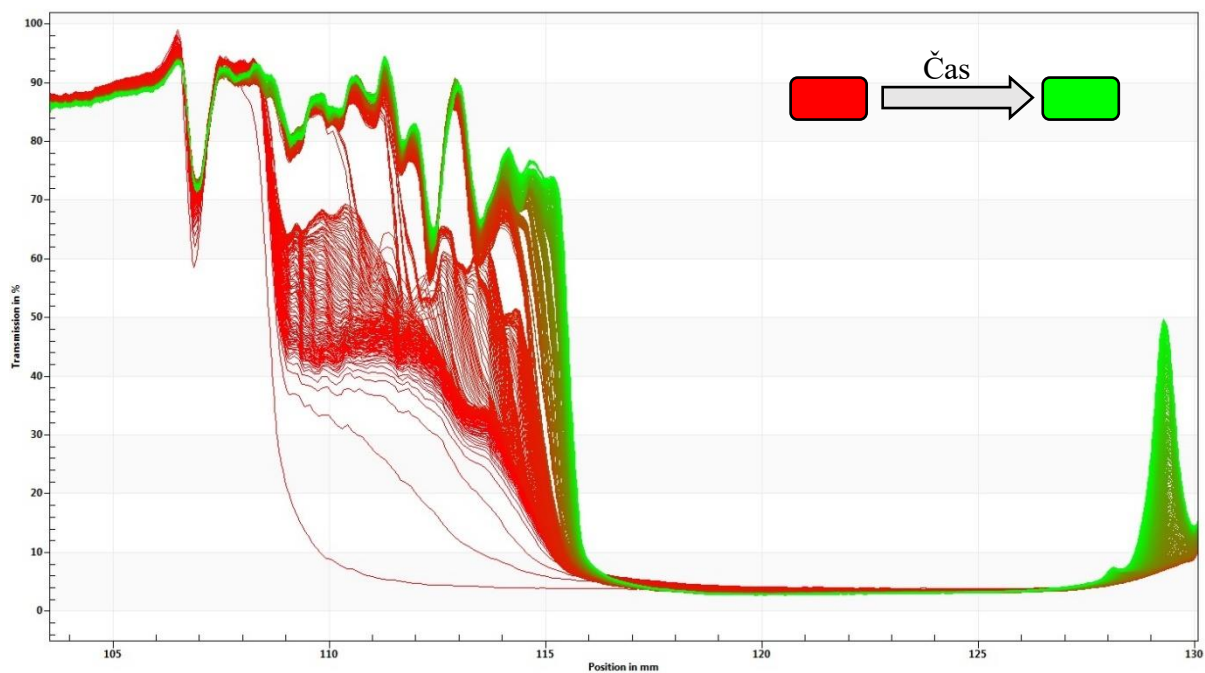
Vzorků A, C, E a F vykazovaly mírně vyšší index nestability. Jelikož byly jejich grafy velice podobné, byl pro ilustraci vybrán graf vzorku A. U těchto vzorků byl sledován vliv přidavku aktivní látky, složení emulzního základu zůstalo neměnné. Jak je vidět na Obr. 34,

docházelo u těchto vzorků k oddělování vodné fáze, což se projevilo jako zvýšení transmise u dna kyvety.



Obr. 34: Graf závislosti transmittance na poloze v kyvetě pro vzorek emulze s přidavkem liposomů (A)

U vzorků B, D a H byl sledován vliv použitého oleje a emulgátoru na stabilitu emulze. Složení aktivních látek se neměnilo. Přestože vzorky D a H mají stejný index nestability, byly si podobnější grafy vzorků B a D. Jako jejich zástupce je zde zobrazen graf vzorku B viz Obr. 35. Zde kromě mírného oddělování vodné fáze u dna kyvety dále pozorujeme, že vzorek se již od začátku analýzy začal stlačovat směrem ke dnu kyvety, což se projevilo posunem menisku a zvýšenou transmitancí v této oblasti. Přestože přidavek emulgátoru do vzorku B odpovídal vypočítanému HLB, byla nakonec stabilnější emulze, která obsahovala konopný olej a jako emulgátor pouze ercawax, který má HLB vyšší. Při testování vlivu použitého oleje při porovnání vzorků D a H vidíme, že hodnoty indexu nestability jsou stejné, ale projevy emulze navenek odlišné. U vzorku H totiž docházelo ke stejnému projevu nestability jako u vzorků A, C a E (oddělování vodné fáze), jen ve vyšší míře, jeho index nestability tedy vzrostl až na hodnotu 0,205.



Obr. 35: Graf závislosti transmitance na poloze v kyvetě pro vzorek emulze s konopným olejem s přidavkem extraktů a částic (B)

Při celkovém vyhodnocení včetně zohlednění dalších charakterizací emulzí, kdy konopný olej podporuje ochranu proti UV záření, lze za nejstabilnější vzorek považovat emulzi D. V další fázi práce by měla následovat podrobnější optimalizace výběru vhodného emulgátoru ke konopnému oleji, aby bylo možné dosáhnout zvýšení stability výsledného produktu.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací biomateriálů s obsahem aktivních přírodních UV filtrů. Jako aktivní látky byly vybrány extrakty lipofilní povahy z vybraných druhů zeleniny (rajče, mrkev, paprika, špenát), kvasinky *Rhodotorula glutinis* a mikrořasy *Chlorella vulgaris*. Nejprve byl optimalizován extrakční postup porovnáváním účinnosti extrakce pomocí řady různých rozpouštědel. Jako nejefektivnější postup byla vybrána extrakce dle Folche využívající směsi chloroform:ethanol 2:1. Následně byly provedeny extrakce a analyzováno složení těchto extraktů pomocí HPLC. Nejvíce karotenoidů obsahovala mrkev, což korespondovalo s informacemi z literatury. Dále obsahovala vysoké množství karotenoidů paprika a rajče. Kromě obsahu celkových karotenoidů byl sledován individuálně obsah β -karotenu, α -tokoferol acetátu a koenzymu Q10.

Připravené extrakty byly enkapsulovány do liposomových částic připravených metodou sonikace. U částic byla charakterizována průměrná velikost, která se u většiny vzorků pohybovala v rozmezí 150–300 nm. Polydisperzní index nepřekročil hodnotu 0,50, takže vzorky byly relativně monodisperzní. Při sledování koloidní stability bylo zjištěno, že roztoky liposomů byly stabilní jak po přípravě, tak i po jednom týdnu a jenom měsíci uchovávání. Zároveň i velikost liposomů zůstávala téměř nezměněná po dobu jednoho měsíce skladování. Enkapsulační účinnost dosahovala průměrně 50 %. Výjimku tvořily částice s přídavkem PHB, u kterých dosahovala enkapsulační účinnost i více než 70 %.

Dále byla sledována antioxidační aktivita prázdných liposomů, liposomů s aktivní složkou a supernatantů. Nejvyšší antioxidační aktivita byla prokázána u roztoků liposomů. Při porovnávání jednotlivých typů liposomů vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu vzorek s enkapsulovanými extrakty z mrkve a špenátu. U vybraných typů částic byl dále stanoven obsah fosfolipidů a cytotoxický efekt na lidské keratinocyty. Liposomy s extraktem z kvasinky ani z mikrořasy nevykazovaly cytotoxický efekt na lidské keratinocyty při žádné z testovaných koncentrací.

Posledním krokem byla příprava emulzí oleje ve vodě s přídavkem aktivních látek. Nejprve byla testována metoda pro stanovení SPF, která se osvědčila v rozmezí SPF 6–30. Touto metodou byly sledovány protektivní účinky proti UVB záření u jednotlivých komponent navržených emulzí (olejů, extraktů a částic) a i výsledných emulzí. Jelikož parařinový olej, který byl složkou původního složení emulze, vykazoval jen malý protektivní účinek, byla snaha tento olej nahradit vhodnějším typem. Proto byla následně testována celá řada rostlinných olejů, ze kterých byl vybrán olej konopný s SPF 2,9.

Z extraktů měly nejvyšší absorbanci v UV oblasti extrakty z rajčete, papriky a mikrořasy *Chlorella vulgaris*. Z roztoků částic byl nejúčinnější v ochraně proti UVB záření vzorek se směsným extraktem z kvasinky *Rhodotorula glutinis* a mikrořasy *Chlorella vulgaris* vykazující SPF 7 a poté se špenátem se SPF 5,8. Přídavek PHB při formulaci liposomů umožnil následně dosáhnout hodnoty SPF 20. U připravených emulzí byl dále sledován vliv jednotlivých složek na SPF, a to přídavků konopného oleje, extraktu a liposomů. Při použití konopného oleje došlo k zvýšení SPF až na 5,2. Dále přídavek extraktu zvýšil SPF na hodnotu 2,1 a přídavkem 5 ml liposomů na hodnotu 1,8. Nakonec byla připravena emulze

s kombinací všech předešlých modifikací. Takto bylo dosaženo přípravy finální emulze s SPF 9,7.

Jako poslední byla sledována stabilita navržených emulzí pomocí analytické centrifugace. Nejstabilnější byl vzorek emulze s původním základem a s přídavkem 3,0 mg extraktu z papriky. Při komplexním posouzení dat sedimentační stability emulzí zohledňujících rovněž míru protekce vůči UVB záření i stabilitu částic byla jako nejlepší vyhodnocena emulze s modifikací olejové fáze konopným olejem, přídavkem extraktu z *Rhodotorula glutinis* a *Chlorella vulgaris* a částic, kdy byl jako emulgátor použit ercawax. V navazující práci by bylo vhodné dále testovat složení emulzí především s ohledem na emulgátory, aby bylo možné zvýšit výslednou stabilitu navržených emulzí.

7 BIBLIOGRAFIE

- [1] ETTLER, Karel. *Fotoprotekce kůže: ochrana kůže před účinky ultrafialového záření*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004, 133 s.
- [2] *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, 1003 s.
- [3] BAUMANN, Leslie a Leslie BAUMANN. *Cosmetic dermatology and medicine: principles and practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2009, xiv, 366 p.
- [4] SAMBANDAN, Divya R. a Desiree RATNER. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011, **64**(4), 748-758. DOI: 10.1016/j.jaad.2010.01.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962210000228>
- [5] KONRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNE. *Funkční histologie*. 2. Jinočany: H&H, 2000.
- [6] ŠTORK, Jiří. *Dermatovenerologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2008, xv, 502, [2] s.
- [7] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. Jinočany: H&H, 2000.
- [8] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Překlad 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 2012.
- [9] PINNELL, Sheldon R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003, **48**(1), 1-22. DOI: 10.1067/mjd.2003.16. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203500056>
- [10] GONZÁLEZ, Salvador, Manuel FERNÁNDEZ-LORENTE, Yolanda GILABERTE-CALZADA, Jean KRUTMANN, Daniel YAROSH a Dominique LEROY. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*. 2008, **26**(6), 471-482. DOI: 10.1007/978-3-662-08585-1_48.
- [11] SALVADOR, A. a A. CHISVERT. Sunscreen analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **537**(1-2), 1-14. DOI: 10.1016/j.aca.2005.01.055. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005001169>
- [12] SILVIA DÍAZ-CRUZ, M., Marta LLORCA, Damià BARCELÓ a Damià BARCELÓ. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, **27**(10), 873-887. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608001878>
- [13] MITCHNICK, Mark A., David FAIRHURST a Sheldon R. PINNELL. Microfine zinc oxide (Z-Cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999, **40**(1), 85-90. DOI: 10.1016/s0190-9622(99)70532-3.
- [14] PINNELL, Sheldon R., David FAIRHURST, Robert GILLIES, Mark A. MITCHNICK a Nikiforos KOLLIAS. Microfine Zinc Oxide is a Superior Sunscreen Ingredient to Microfine Titanium Dioxide. *Dermatologic Surgery*. 2000, **26**(4), 309-314. DOI: 10.1046/j.1524-4725.2000.99237.x.

- [15] SARAF, Swarnlata a ChanchalDeep KAUR. In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*. 2010, **2**(1), 22-. DOI: 10.4103/0974-8490.60586. Dostupné také z: <http://www.phcogres.com/text.asp?2010/2/1/22/60586>
- [16] MALSAWMTLUANGI, C., Kumar Nath DEEPAK a Jamatia ITALINI. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013, **3**(09), 150-151. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3925.
- [17] BORGUINI, Renata Galhardo a Elizabeth A. FERRAZ DA SILVA TORRES. Tomatoes and Tomato Products as Dietary Sources of Antioxidants. *Food Reviews International*. 2009, **25**(4), 3315-325. DOI: 10.1080/87559120903155859. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120903155859>
- [18] WALTER, Kenneth A., ed. a Michael S. ROBERT, ed. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches*. 1. CRC Press, 2007.
- [19] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2009, **36**, 163-180. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0492-9>
- [20] STRATI, I.F. a V. OREOPOULOU. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food research international*. 2014, **65**, 311-321. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.09.032. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914006322>
- [21] DRDÁK, Milan. *Technológia rastlinných neúdržných potravín*. 1. Bratislava: Alfa, 1989, s. 301.
- [22] KIM, Ji-Sun, Chul Geon AN, Jong-Suk PARK, Yong Pyo LIM a Suna KIM. Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chemistry* [online]. 2016, **201**, 64-71 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.041. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616300371>
- [23] KONING, Ross E. Light. *Plant Physiology Information Website* [online]. 1994 [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: http://plantphys.info/plant_physiology/light.shtml
- [24] MALISORN, C. a W. SUNTORNSUK. Improved β -carotene production of Rhodotorula glutinis in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, **43**, 27-32. DOI: 10.1016/j.bej.2008.08.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X0800260X>
- [25] BURGESS, Cheryl M. *Cosmetic dermatology*. 1. Berlin: Springer, 2005.
- [26] Basic Report: 11529, Tomatoes, red, ripe, raw, year round average. *United States Department of Agriculture Agricultural Research Service: National Nutrient Database for Standard Reference Release 28* [online]. USA, 2016 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3223?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=&measureby=&Qv=1&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>

- [27] Basic Report: 11124, Carrots, raw. *United States Department of Agriculture Agricultural Research Service: National Nutrient Database for Standard Reference Release 28* [online]. USA, 2016 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2901?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=&measureby=&Qv=1&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>
- [28] Basic Report: 11457, Spinach, raw. *United States Department of Agriculture Agricultural Research Service: National Nutrient Database for Standard Reference Release 28* [online]. USA, 2016 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3167?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=&measureby=&Qv=1&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>
- [29] Basic Report: 11821, Peppers, sweet, red, raw. *United States Department of Agriculture Agricultural Research Service: National Nutrient Database for Standard Reference Release 28* [online]. USA, 2016 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3438?manu=&fgcd=&ds=>
- [30] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. 1. Chichester: John Wiley, 1998.
- [31] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s.
- [32] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVI. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 108 s.
- [33] LAM, Man Kee, Mohammad Iqram YUSOFF, Yoshimitsu UEMURA, Jun Wei LIM, Choon Gek KHOO, Keat Teong LEE a Hwai Chyuan ONG. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*. 2017, **103**, 197–207. DOI: 10.1016/j.renene.2016.11.032. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116310011>
- [34] POSTMA, P.R., T.L. MIRON, G. OLIVIERI, M.J. BARBOSA, R.H. WIJFFELS a M.H.M. EPPINK. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*. 2015, **184**, 297–304. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.033. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241401284X>
- [35] FOLCH, Jordi, I. ASCOLI, M. LEES, J. A. MEATH a F. N. LEBARON. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *The Journal of biological chemistry*. Baltimore, etc.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology [etc.], 1951, (1912, 833-841. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/content/191/2/833.long>
- [36] HÁLKOVÁ, Jana a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001, 94 s.
- [37] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s.

- [38] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, 347 s.
- [39] MIHRANYAN, Albert, Natalia FERRAZ a Maria STRØMME. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*. 2012, **57**(5), 875-910. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642511001046>
- [40] KATZ, Linda M., Kapal DEWAN a Robert L. BRONAUGH. Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **85**, 127–137. DOI: 10.1016/j.fct.2015.06.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515300041>
- [41] SHARMA, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, **154**(2), 123-140. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(97\)00135-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(97)00135-x).
- [42] LASIC, D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*. b.r., **16**(7), 307-321. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01220-7. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779998012207>
- [43] BETZ, G, A AEPPLI, N MENSUTINA a H LEUENBERGER. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application☆. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, **296**(1-2), 44-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.02.032>.
- [44] VEMURI, Sriram a C.T RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 1995, **70**(2), 95-111. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7).
- [45] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, **8**(1), 102-. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. Dostupné také z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
- [46] PATIL, Yogita P. a Sameer JADHAV. Novel methods for liposome preparation: review. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2014, , 8-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.01>.
- [47] DUA, J.S. 1, A. C. RANA a A. K. BHANDARI. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2012, (), 14-20. Dostupné také z: <http://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
- [48] GODDARD, E. Desmond, ed. a James V. GRUBER, ed. *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care: Cosmetic Science and Technology*. 1. New Your: Marcel Dekker, INC., 1999.
- [49] AMMALA, Anne. Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013, **35**, 113–124. DOI: 10.1111/ics.12017. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12017>

- [50] KE, Y., X.Y. ZHANG, S. RAMAKRISHNA, L.M. HE a G. WU. Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*. 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.114. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116302971>
- [51] RAM KUMAR PANDIAN, Sureshbabu, Venkatraman DEEPAK, Kalimuthu KALISHWARALAL, Jeyaraj MUNIYANDI, Neelamegam RAMESHKUMAR a Sangiliyandi GURUNATHAN. Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: A green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, **74**(1), 266–273. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.07.029. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509003270>
- [52] ZMEŠKAL, Oldřich, ed. *Chemistry & Life 2015 – Book of Abstracts: Sixth meeting on chemistry and life : Brno, Czech Republic*. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015.
- [53] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. *Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids*. b.r. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333>
- [54] Technologie Hydal. *Hydal BioTech* [online]. b.r. [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://hydalbiotech.com/cs/technologie-hydal/>
- [55] VENKATESWAR REDDY, M., Yasuteru MAWATARI, Yuka YAJIMA, Chigusa SEKI, Tamotsu HOSHINO a Young-Cheol CHANG. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from alkylphenols, mono and poly-aromatic hydrocarbons using *Bacillus* sp. CYR1: A new strategy for wealth from waste. *Bioresource Technology*. 2015, **192**, 711–717. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.06.043. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415008342>
- [56] JOBMANN, Monika a Gerald RAFLER. Submicronparticles from biodegradable polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, **242**(1–2), 213–217. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00160-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302001606>
- [57] HAMID, R, Y ROTSHTEYN, L RABADI, R PARIKH a P BULLOCK. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*. 2004, **18**, 703–710. DOI: 10.1016/j.tiv.2004.03.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233304000633>
- [58] STOCKERT, Juan C., Alfonso BLÁZQUEZ-CASTRO, Magdalena CAÑETE, Richard W. HOROBIN a Ángeles VILLANUEVA. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. 2012, **114**, 785–796. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065128112000190>
- [59] SKEHAN, Philip a Ritsa STORENG. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990, **82**(13),

1107-1112.

- [60] LIU, Zheng, Dongying LIU, Jianguo CHENG et al. Lipid-soluble green tea extract: Genotoxicity and subchronic toxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017, **86**, 366–373. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.04.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230017300867>
- [61] © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné také z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [62] MILLER, Nicholas J., Catherine RICE-EVANS, Michael DAVIES, Vimala GOPINATHAN a Anthony MILNER. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. Velká Británie, 1993, **84**, 407-412.
- [63] HUANG, Dejian, Boxin OU a Ronald L. PRIOR. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005, **53**, 1841-1856. DOI: 10.1021/jf030723c. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf030723c>
- [64] ARTS, Mariken J.T.J, Guido R.M.M HAENEN, Hans-Peter VOSS a Aalt BAST. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*. 2004, **42**, 45–49. DOI: 10.1016/j.fct.2003.08.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691503002394>
- [65] VAN DEN BERG, Robin. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry: Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section*. 1999, **66**, 511-517.
- [66] SITTAMPALAM, G. Sitta, ed., Nathan P. COUSSENS, ed. a Kyle BRIMACOMBE, ed. *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>
- [67] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983, **65**, 55-63.
- [68] CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004, **107**(2-3), 125-155. DOI: 10.1016/S0001-8686(03)00115-5. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868603001155>
- [69] TAL-FIGIEL, B. The Formation of Stable W/O, O/W, W/O/W Cosmetic Emulsions in an Ultrasonic Field. *Chemical Engineering Research and Design*. 2007, **85**(5), 730-734. DOI: 10.1205/cherd06199. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876207731040>
- [70] *The HLB System: A Time-saving Guide to Emulsifier Selection* [online]. Wilmington,

- Delaware: ICI Americas Inc., 1980 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: http://www.firp.ula.ve/archivos/historicos/76_Book_HLB_ICI.pdf
- [71] Emulsions and the HLB System. *Scientific Spectator Web based scientific publications: Personal Care Spectator* [online]. 2016 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: http://www.scientificspectator.com/documents/personal%20care%20spectator/HLB_Basics.pdf
- [72] Germaben II. *Lotioncrafter® LLC* [online]. 48 Hope Lane, Eastsound, WA, 2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.lotioncrafter.com/germaben-ii.html>
- [73] OYEDEJI, F.O. a I.E. OKEKE. Comparative Analysis of Moisturising Creams from Vegetable Oils and Paraffin Oil. *Research Journal of Applied Sciences*. 2010, **5**(3), 157–160. DOI: 10.3923/rjasci.2010.157.160. Dostupné také z: <http://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=rjasci.2010.157.160>
- [74] CETYL ALCOHOL. *EWG's Skin Deep Cosmetics Database* [online]. Washington, 2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: https://www.ewg.org/skindeep/ingredient/701263/CETYL_ALCOHOL/
- [75] *Stanovení sedimentační stability emulzí* [online]. b.r. [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf
- [76] VANĚK, Ondřej a Karel BEZOUŠKA. Analytická centrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, **104**(12), 1155–1162.
- [77] TORRES, Priscila Bezerra, Fungyi CHOW, Cláudia Maria FURLAN, Fernanda MANDELLI, Adriana MERCADANTE a Déborah Yara Alves Cursino dos SANTOS. Standardization of a protocol to extract and analyze chlorophyll a and carotenoids in *Gracilaria tenuistipitata* Var. Liui. Zhang and Xia (Rhodophyta). *Brazilian Journal of Oceanography*. 2014, **62**(1), 57-63. DOI: 10.1590/s1679-87592014068106201. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [78] FOLCH, Jordi, M. LEES a G. H. SLOANE STANLEY. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957, **226**(1), 497-509.
- [79] LI, Xueshu, Jaroslav TURÁNEK, Pavlína KNÖTIGOVÁ et al. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009, **73**(1), 65–74. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.04.023. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509001891>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV záření – ultra fialové záření

UVA – ultrafialové záření v oblasti 320–400 nm

UVB – ultrafialové záření v oblasti 280–320 nm

DNA/RNA – deoxy/ribonukleová kyselina

ROS – „Reactive oxygen species“ reaktivní částice kyslíku

SPF – ochranný faktor proti slunečnímu záření

PHA – polyhydroxyalkanoáty

PHB – poly(3-hydroxybutyrát)

ABTS – 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina)

TEAC – „Trolox equivalent antioxidant capacity“

MTT – terazoliovou sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid, methyl-thiazolyl-tetrazolium